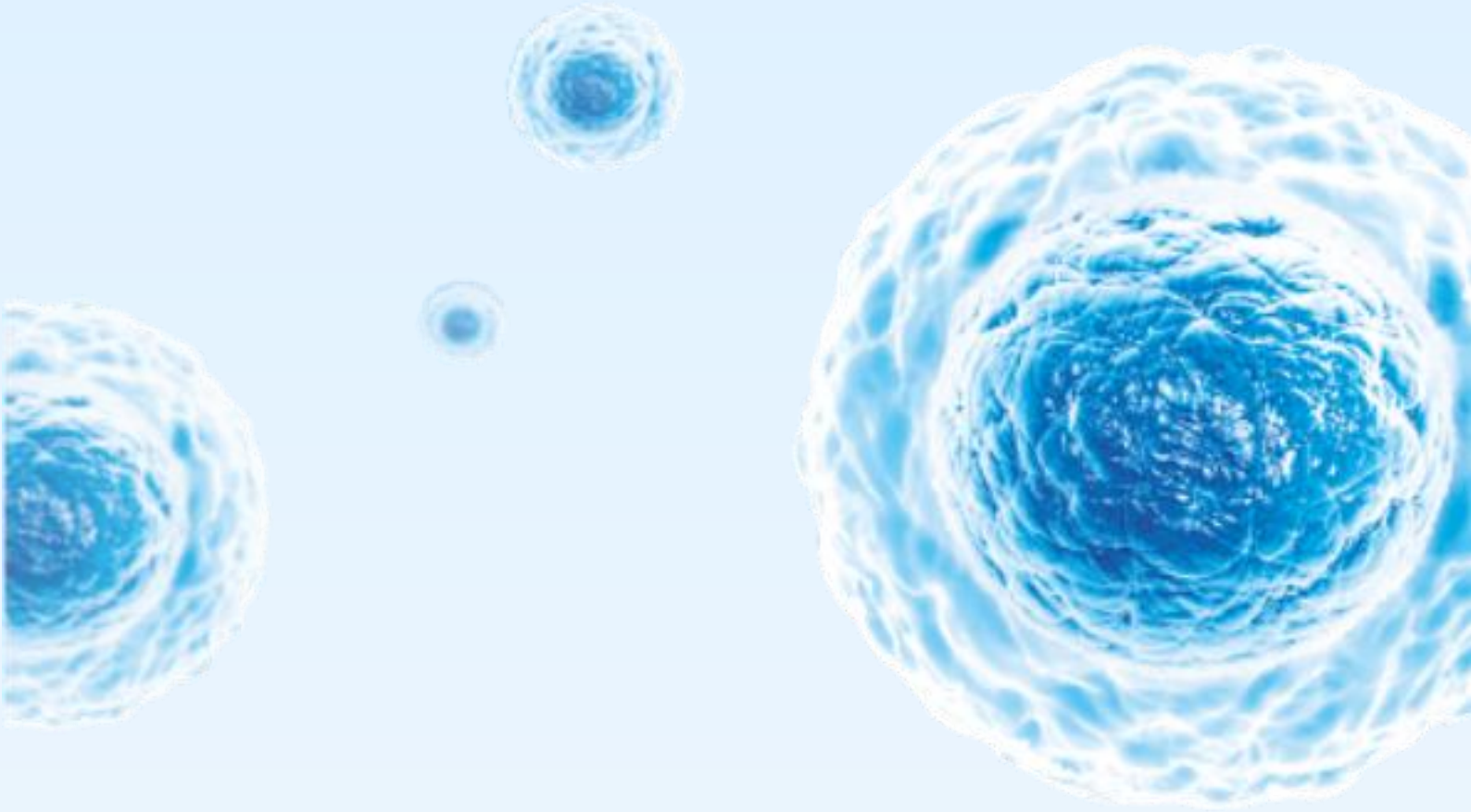
Singleron
新格元生物科技



RetroSCOPE®FFPE Single Nucleus Whole Transcriptome Library Kit

RetroSCOPE®FFPE 单细胞核全转录组文库构建试剂盒用户手册 · 手动版

RUO 仅供科学研究使用

2026.08

本手册适用于以下产品

目录号	产品名称	规格
5585311	RetroSCOPE® FFPE Single Nucleus Whole Transcriptome Library Kit	2 RXNs
5585312	RetroSCOPE® FFPE Single Nucleus Whole Transcriptome Library Kit	16 RXNs
N/A	RetroSCOPE® FFPE Single Nucleus Whole Transcriptome Library Kit (HD)	2 RXNs
N/A	RetroSCOPE® FFPE Single Nucleus Whole Transcriptome Library Kit (HD)	16 RXNs

版本信息与修订历史

版本号	更新内容
2026/08	初版

版权说明

新格元生物科技有限公司保留所有解释权。本手册中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 组分清单 ..... - 1 -

2. 自备仪器耗材试剂 ..... - 5 -

3. 工作流程与操作时间 ..... - 6 -

4. 准备工作 ..... - 7 -

5. 脱蜡、复水与解交联 ..... - 8 -

5.1 脱蜡 ..... - 8 -

5.2 复水 ..... - 9 -

5.3 解交联 ..... - 10 -

6. 细胞核分离 ..... - 11 -

6.1 细胞核分离 ..... - 11 -

7. 逆转录与接头连接 ..... - 12 -

7.1 逆转录 ..... - 13 -

7.2 接头连接 ..... - 14 -

8. SCOPE-chip 上样 ..... - 16 -

8.1 SCOPE-chip 预润洗 ..... - 16 -

8.2 Barcode Beads V3 预处理 ..... - 17 -

8.3 裂解液配置 ..... - 18 -

8.4 细胞核重悬液准备 ..... - 18 -

8.5 将细胞核装载至 SCOPE-chip ..... - 19 -

8.6 装载 Barcode Beads ..... - 20 -

8.7 细胞核裂解与 mRNA 捕获 ..... - 21 -

8.8 Barcode Beads 回收 ..... - 21 -

9. 第二链合成与 cDNA 扩增 ..... - 23 -

9.1 第二链合成 ..... - 23 -

9.2 cDNA 扩增 ..... - 24 -

9.3 cDNA 纯化 ..... - 25 -

9.4 cDNA 质控 ..... - 27 -

10. 文库制备 ..... - 28 -

10.1 文库制备与加索引 ..... - 28 -

10.2 文库纯化 ..... - 29 -

10.3 文库质控 ..... - 30 -

附录 A：SCOPE-chip 操作视频 ..... - 31 -

附录 B：测序 ..... - 32 -

1. 基本信息

1.1 产品概述

RetroSCOPE® FFPE 单细胞核全转录组文库构建试剂盒为从 FFPE 或固定组织中捕获核 RNA 并将其转化为可用于 NGS 的文库提供了完整解决方案。该方法不仅可分析多聚腺苷酸化的 mRNA，还可对编码 RNA 和非编码 RNA 进行全面分析。

RetroSCOPE® FFPE 单细胞核全转录组文库构建试剂盒使用带微孔的便携式微流控芯片 SCOPE-chip。SCOPE-chip 集成了单细胞核分离、细胞裂解以及包括 mRNA 在内的细胞多聚腺苷酸化 RNA 捕获等多个处理步骤。SCOPE-chip 操作简便，无需专用仪器，适用于多种组织类型来源的细胞。

1.2 组分清单

RetroSCOPE® FFPE 单细胞核全转录组文库构建试剂盒（2 RXNs）

Box 1: SCOPE-chips SD & Barcoding Beads V3 for FFPE

收到后储存在 2℃ 至 8℃。

组分	数量	体积	管盖颜色
SCOPE-chip SD	2	–	–
Singleron Magnetic Rack	1	–	–
Barcode Beads SD V3	1	1.8 mL	黑色
Wash Buffer A	1	7 mL	白色
Wash Buffer B	1	1.8 mL	白色
0.9x Purification Beads Wash Buffer	1	1.5 mL	白色
Plastic Pestle	2	–	–

Box 2: FFPE Single Nucleus RNA Amplification & Library Kit

收到后储存在 -25℃ 至 -15 ℃。

组分	数量	体积	管盖颜色
1× Antigen Retrieval Solution	2	1.5 mL	黄色
RNase Inhibitor	1	50 μL	绿色
FFPE Nuclei Dissociation Buffer	2	1.5 mL	红色

FFPE Nuclei Dissociation Enzyme 1	1	25 µL	红色
FFPE Nuclei Dissociation Enzyme 2	1	5 µL	红色
100 mM DTT	1	100 µL	绿色
RT Master Mix	1	400 µL	紫色
FFPE NucRT Primer	1	15 µL	紫色
Reverse Transcriptase	1	25 µL	紫色
10 × Adapter Buffer	1	25 µL	蓝色
FFPE Adapter	1	15 µL	蓝色
FFPE Adapter Conjugator	1	5 µL	蓝色
FFPE Lysis Buffer, Stock	1	300 µL	橙色
FFPE Lysis Enhancer	1	20 µL	橙色
10x Extension buffer	1	25 µL	浅紫色
dNTP mix	1	10 µL	浅紫色
Extension Enzyme	1	10 µL	浅紫色
Amplification Master Mix	1	400 µL	透明
FFPE primer mix	1	75 µL	透明
Amplification Enzyme	1	20 µL	透明
Library Amp Mix V3	1	60 µL	白色
Indexing Primer Mix 1（ATCACGTT）	1	30 µL	白色
Indexing Primer Mix 2（CGATGTTT）	1	30 µL	白色

重要提示：

- 请按说明储存各组分。
- 请勿将 Barcoding Beads 储存在 0 ℃以下（请勿冷冻）。

RetroSCOPE® FFPE 单细胞核全转录组文库构建试剂盒（16 RXNs）

Box 1: SCOPE-chips SD for FFPE

收到后储存在室温。

组分	数量	体积	管盖颜色
SCOPE-chip SD	16	–	–
Singleron Magnetic Rack	4	–	–
Plastic Pestle	16	–	–

Box 2: Barcoding Beads V3 & Wash Buffer

收到后储存在 2℃ 至 8℃。

组分	数量	体积	管盖颜色
Barcode Beads SD V3	8	1.8 mL	黑色
Wash Buffer A	7	7 mL	白色瓶
Wash Buffer B	6	1.8 mL	白色
0.9× Purification Beads Wash Buffer	1	8 mL	白色瓶

Box 3: FFPE Antigen Retrieval & Dissociation

收到后储存在 −25℃ 至 −15℃。

组分	数量	体积	管盖颜色
1× Antigen Retrieval Solution	3	6 mL	白色瓶
FFPE Nuclei Dissociation Buffer	3	6 mL	白色瓶

Box 4:FFPE Single Nucleus RNA Amplification Reagents SD & Library Reagents

收到后储存在 −25℃ 至 −15℃。

组分	数量	体积	管盖颜色
FFPE Nuclei Dissociation Enzyme 1	1	180 µL	红色
FFPE Nuclei Dissociation Enzyme 2	1	20 µL	红色
RNase Inhibitor	3	120 µ L	绿色
RT Master Mix	1	1500 µ L	紫色
100 mM DTT	1	400 µL	绿色
FFPE NucRT Primer	1	90 µL	紫色
Reverse Transcriptase	1	130 µL	紫色
10 × Adapter Buffer	1	100 µ L	蓝色
FFPE Adapter	1	90 µL	蓝色
FFPE Adapter Conjugator	1	20 µL	蓝色
FFPE Lysis Buffer, Stock	1	1600 µL	橙色
FFPE Lysis Enhancer	1	90 µL	橙色
10x Extension buffer	1	180 µL	浅紫色
dNTP mix	1	60 µL	浅紫色
Extension Enzyme	1	45 µL	浅紫色
Amplification Master Mix	2	1600 µL	透明
FFPE primer mix	1	550 µL	透明
Amplification Enzyme	1	160 µL	透明
Library Amp Mix V3	1	480 µL	白色
Indexing Primer Mix 1（ATCACGTT)	1	30 µL	白色
Indexing Primer Mix 2（CGATGTTT）	1	30 µL	白色
Indexing Primer Mix3(TTAGGCAT)	1	30 µL	白色

Indexing Primer Mix4(TGACCACT)	1	30 μL	白色
Indexing Primer Mix5(ACAGTGGT)	1	30 μL	白色
Indexing Primer Mix6(GCCAATGT)	1	30 μL	白色
Indexing Primer Mix7(CAGATCTG)	1	30 μL	白色
Indexing Primer Mix8(ACTTGATG)	1	30 μL	白色

重要提示：

- 请按说明储存各组分。
- 请勿将 Barcoding Beads 储存在 0 ℃以下（请勿冷冻）。

2. 自备仪器耗材试剂

两个工作区（pre-PCR 和 post-PCR）均需准备：

- 无水乙醇
- 无核酸酶水
- 1.5 mL 或 2 mL 核酸低吸附管
- 15 mL 和 50 mL 锥形离心管
- 血清移液管
- 单通道移液器（p10、p200 和 p1000）
- 无菌、经 RNase/DNase-free 认证的带滤芯吸头
- 小型离心机
- 涡旋振荡器
- Janus 磁力架（新格元 货号 1120020202）或等效产品

用于 FFPE 处理、细胞核分离及 SCOPE-chip 上样（Pre-PCR）

- RNase Away 或等效产品
- 切片机
- 二甲苯
- 20 μm 细胞滤网
- 旋转混匀仪
- 用于 SCOPE-chip 上样的无菌、无 RNase/DNase p200 滤芯吸头（Eppendorf 货号 0030078551、Jet Biofil 货号 PMT231200、VWR 货号 732-3701、Rainin 货号 30389242）
- 配备水平转子的冷冻离心机，可兼容 15 mL 和 50 mL 锥形离心管
- 倒置显微镜
- Thermo Mixer 或等效产品
- PBS pH 7.4 (不含 Ca^{2+}，不含 Mg^{2+})
- 血细胞计数板和 DAPI
- 10% Tween-20

cDNA 扩增与文库制备（Post-PCR）

- PCR 仪
- Agilent Fragment Analyzer 5200 (Agilent 货号 M5310AA) 或等效产品。
- Qubit 4 荧光计（Thermo Fisher 货号 Q33238）、检测管和 1x dsDNA HS 检测试剂盒（Thermo Fisher 货号 Q32856、Q33230）
- AMPure XP (Beckman Coulter 货号 A63880, A63881, A63882)
- 10mM Tris-HCl pH 8.5 或洗脱缓冲液 (EB, Qiagen 货号 19086)
- 0.2 mL 八联 PCR 管或 PCR 单管

重要提示：耗材必须无菌且经 RNase/DNase-free 认证。

3. 工作流程与操作时间

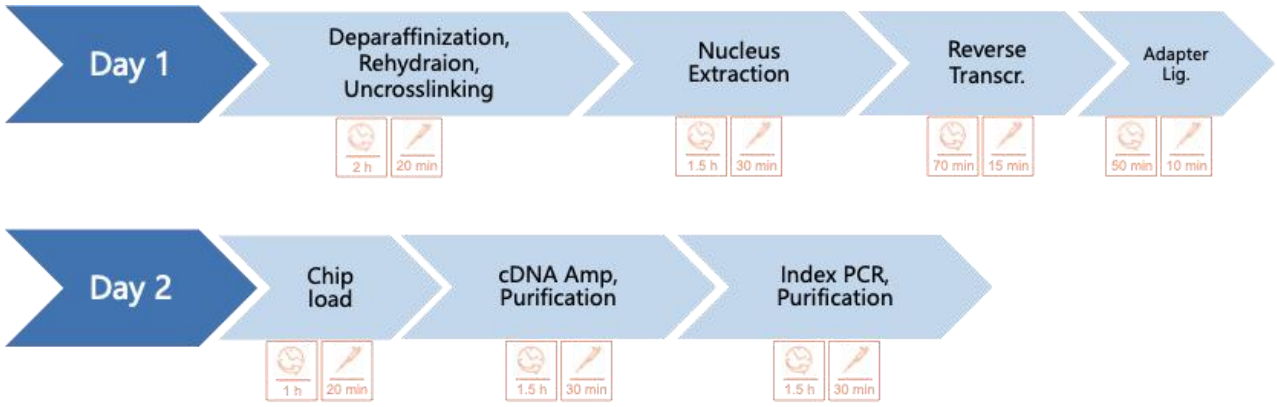


图 1：工作流程与时间轴概览

4. 准备工作

建议用户为所有需要洁净条件的 pre-PCR 步骤设置“洁净工作区”，包括组织解离、SCOPE-chip 上样和逆转录。开展 RNA 相关操作时，应使用 RNase Away（或等效产品）清洁所有工作台面和移液器，并佩戴合适的口罩和实验手套，以避免污染和 RNA 降解。

另设一个工作区（post-PCR），用于进行 cDNA 扩增、纯化和质控，以及文库制备和质控。

重要提示：所有缓冲液使用前均需充分混匀。如缓冲液中出现沉淀或沉积物，请轻柔吹打混匀，并确保使用前溶液澄清。

5. 脱蜡、复水与解交联

5.1 脱蜡



用户自备：

- FFPE 组织块或穿刺活检样本
- 切片机
- 二甲苯（需妥善处理：需交由持有许可的危险废物处理公司处理）

对于 FFPE 蜡块和粗针穿刺活检样本：

1. 使用切片机切除并弃去组织表面最初的 10 μm。
2. 对于 FFPE 蜡块，使用切片机切成蜡卷。请参考下表取材，以获得足量细胞核。

组织表面积	蜡卷厚度	蜡卷数量
>100 mm^2	50 μm	3
	25 μm	3
	10 μm	15
	5 μm	30*
50–100 mm^2	50 μm	5
	25 μm	5
	10 μm	25*
	5 μm	50*
30–50 mm^2	50 μm	10
	25 μm	10
	10 μm	50*
	5 μm	100*

*每个 1.5 mL 管中最多加入 10 个蜡卷。

对于穿刺活检样本，使用镊子和手术刀尽量去除组织芯周围的石蜡，然后将完整组织芯放入 1.5 mL 管中。

重要提示：对于经固定但未进行石蜡包埋的组织，请直接进行第 6 节细胞核分离，再按第 5.3 节进行解交联。

3. 在通风橱中，加入 1 mL 二甲苯。使用封口膜密封管口，防止泄漏。
4. 将管置于旋转混匀仪上，室温旋转孵育 10 分钟，确保充分混匀。
5. 短暂离心，在不扰动组织的情况下弃去二甲苯。
6. 在通风橱中加入 1 mL 二甲苯，使用封口膜密封管口，防止泄漏。
7. 将管重新置于旋转混匀仪上，室温旋转孵育 10 分钟，确保充分混匀。

8. 短暂离心，在不扰动组织的情况下弃去二甲苯。

9. 检查是否仍有石蜡残留。如仍有石蜡，按需重复步骤 6–8。穿刺活检样本可能需要进行 3–4 轮脱蜡。

10. 确认无石蜡残留后，短暂离心并彻底去除二甲苯。

11. 继续进行复水步骤。

5.2 复水

准备材料:

- 脱蜡后的组织（来自上一步）



用户自备:

- 无水乙醇
- 无核酸酶水

1. 为每个样本配制以下乙醇溶液用于复水，并置于冰上：

组分	95% 乙醇(μL)	70% 乙醇(μL)	50%乙醇(μL)
无水乙醇	950	700	500
无核酸酶水	50	300	500
总计	1 000	1 000	1 000

2. 向完全脱蜡的组织中加入 1 mL 无水乙醇，冰上孵育 5 分钟。

3. 短暂离心，在不扰动组织的情况下弃去乙醇。

4. 再重复一次无水乙醇洗涤（步骤 2–3）。

5. 向组织中加入 1 mL 95%乙醇，冰上孵育 5 分钟。

6. 短暂离心，在不扰动组织的情况下弃去 95%乙醇。

7. 向组织中加入 1 mL 70%乙醇，冰上孵育 5 分钟。

8. 短暂离心，在不扰动组织的情况下弃去 70%乙醇。

9. 向组织中加入 1 mL 50%乙醇，冰上孵育 5 分钟。

10. 短暂离心，在不扰动组织的情况下弃去 50%乙醇。

11. 向组织中加入 1 mL 无核酸酶水，冰上孵育 5 分钟。

12. 短暂离心，在不扰动组织的情况下弃去无核酸酶水。

操作提示: 复水后，组织切片容易黏附在管壁和吸头上。操作时应格外小心，避免样本损失。

5.3 解交联



准备材料:

- 复水后的组织（来自上一步）
- 1× Antigen Retrieval Solution (黄色)
- RNase Inhibitor (绿色)

用户自备:

- 10% Tween 20
- 1x PBS

1. 将水浴锅或金属浴预热至 95℃。
2. 向复水后的组织样本中加入 1 mL 1× Antigen Retrieval Solution。
3. 95℃孵育 30 分钟。
4. 孵育期间，按下表配制 FFPE Nuclei Wash Buffer，混匀后置于冰上。

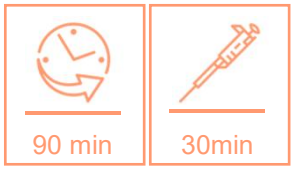
FFPE Nuclei Wash Buffer

组分	1 RXN（μL） ×1	2 RXNs（μL） ×2.2
PBS	2 979	6 553.8
10% Tween	15	33
RNase Inhibitor	6	13.2
总计	3 000	6 600

5. 将装有组织的管置于冰上冷却 3 分钟。
6. 短暂离心，在不扰动组织的情况下弃去上清液。
7. 立即进行细胞核分离。或者，将解交联后的组织浸没于 500 μL FFPE Nuclei Wash Buffer 中，在 −80℃下最多保存 3 天。

6. 细胞核分离

6.1 细胞核分离



准备材料:

- 解交联后的组织（来自上一步）
- FFPE Nuclei Dissociation Buffer (红色)
- FFPE Nuclei Dissociation Enzyme 1 (红色)
- FFPE Nuclei Dissociation Enzyme 2 (红色)
- RNase Inhibitor (绿色)

用户自备:

- 20 µm 细胞滤网
- DAPI
- 10% Tween 20
- 1x PBS
- FFPE Nuclei Wash Buffer (步骤 5.3 中配置)

1. 在冰上解冻 FFPE Nuclei Dissociation Buffer 和 FFPE Nuclei Dissociation Enzymes。涡旋混匀、短暂离心后置于冰上，并确保试剂完全解冻。

2. 按下表在冰上配制 FFPE tissue nuclei dissociation solution。涡旋混匀、短暂离心后置于冰上。

FFPE tissue nuclei dissociation solution:

组分	1 RXN（µL） ×1	2 RXNs（µL） ×2.2
FFPE Nuclei Dissociation Buffer	985	2 167
FFPE Nuclei Dissociation Enzyme 1	10	22
RNase Inhibitor	5	11
总计	1 000	2 200

**注:对于肝脏类样本,推荐 FFPE Nuclei Dissociation Enzyme 1 使用量为 40µL,同步减少 FFPE Nuclei Dissociation Buffer 使用量为 955 µL，其他组分不变。*

3. 如组织保存在−80℃，请在冰上解冻，短暂离心，并在不扰动组织的情况下弃去 FFPE Nuclei Wash Buffer。

4. 在冰上，向解交联后的组织中加入 100 µL FFPE tissue nuclei dissociation solution。

5. 在冰上，用研磨杵以旋转方式轻柔匀浆 5 分钟，或直至无大块组织残留。为防止液体溅出，处理过程中避免上下捣动。

重要提示：对于经固定但未石蜡包埋的组织，取 20–50 mg 组织置于 1.5 mL 管中。在冰上加入 100 µL FFPE tissue nuclei dissociation solution，并用剪刀剪碎。继续步骤 5。

6. 向匀浆后的组织中加入剩余约 900 µL FFPE tissue nuclei dissociation solution，通过上下吹打充分混匀。

7. 37℃、900 rpm 振荡孵育 30 分钟。每 10 分钟取 10 µL 样品在显微镜下观察；当无明显大块组织碎片时终止消化。

8. 加入 1 µL FFPE Nuclei Dissociation Enzyme 2，室温孵育 5 分钟。

9. 立即以 10,000 × g 离心 3 分钟，在不扰动细胞核沉淀的情况下弃去上清液。

10. 用 1 mL FFPE Nuclei Wash Buffer 重悬沉淀。

11. 将 20 µm 细胞滤网置于 15 mL 锥形离心管上。

12. 将重悬后的细胞核悬液通过 20 µm 细胞滤网过滤，并将滤液收集至已标记的 15 mL 锥形离心管中。

13. 保持滤网置于 15 mL 锥形离心管上，用 2 mL 预冷 PBS 冲洗滤网。滤液总体积应约为 3 mL。

14. 将含细胞核的滤液以 500 × g 离心 5 分钟。

15. 在不扰动细胞核沉淀的情况下弃去上清液。

16. 用 50 µL 预冷 FFPE Nuclei Wash Buffer 上下吹打，轻柔重悬沉淀。

17. 向分离的细胞核中加入 50 µL DAPI 进行染色，上下吹打轻柔混匀。避光并在冰上孵育 5 分钟。

18. 将染色后的细胞核以 500 × g 离心 5 分钟。

19. 用 500 µL 预冷 FFPE Nuclei Wash Buffer 上下吹打，轻柔重悬沉淀，并置于冰上。

20. 使用血细胞计数板和倒置显微镜评估细胞核完整性并计数；在荧光和明场条件下观察细胞核形态。

重要提示：对于经固定但未石蜡包埋的组织，先进行第 5.3 节“解交联”，再进入第 7 节“逆转录与接头连接”。

7. 逆转录与接头连接

7.1 逆转录



准备材料:

- 细胞核悬液（来自上一步）
- RT Master Mix (紫色)
- FFPE NucRT Primer (紫色)
- RNase Inhibitor (绿色)
- Reverse Transcriptase (紫色)

用户自备:

- 预冷的无核酸酶水
- FFPE Nuclei Wash Buffer (步骤 5.3 中配置)

1. 在 PCR 仪上按下表设置逆转录程序，热盖温度设为 50℃。

热盖温度 50 ℃	反应体积 100 µL	
步骤	温度	时间
1	25℃	10 min
2	42℃	30 min
3	4℃	保持

2. 在冰上解冻 RT Master Mix、100 mM DTT 和 FFPE NucRT Primer。涡旋混匀、短暂离心后置于冰上，并确保试剂完全解冻。

重要提示: 如 RT Master Mix 中出现沉淀，请涡旋混匀直至溶液澄清。

3. 按下表在冰上配制 RT Mix。按表中从上到下的顺序加入试剂，涡旋混匀、短暂离心后置于冰上。

组分	1 RXN（µL） × 1	2 RXNs（µL） × 2.2
RT Master Mix	60	132
预冷的无核酸酶水	27.5	60.5
FFPE NucRT Primer	5	11
RNase Inhibitor	2.5	5.5
Reverse Transcriptase	5	11
总计	100	220

4. 从第 6 节获得的细胞核中取 2 × 10^5 – 5 × 10^5 个，加入新标记的 1.5 mL 管。
5. 4℃、850 × g 离心 5 分钟。
6. 小心去除上清液，加入 100 µL RT Mix，上下吹打轻柔混匀以重悬细胞核。

7. 将悬液转移至 0.2 mL 管中，置于 PCR 仪并启动逆转录程序。
8. PCR 仪降至 4℃ 后，以 850 × g 离心 5 分钟。
9. 小心去除上清液，避免扰动细胞核沉淀。
10. 用 200 µL 预冷 FFPE Nuclei Wash Buffer 轻柔重悬细胞核，以 850 × g 离心 5 分钟，小心去除上清液并避免扰动细胞核沉淀；该步骤共重复两次。
11. 可在 −80℃下最多保存 48 小时，或立即进行下一步。

7.2 接头连接



准备材料:

- 细胞核悬液（来自上一步）
- 10x Adapter Buffer (蓝色)
- FFPE Adapter (蓝色)
- FFPE Adapter Conjugator (蓝色)
- RNase Inhibitor (绿色)

用户自备:

- 预冷的无核酸酶水
- FFPE Nuclei Wash Buffer (步骤 5.3 中配置)

1. 在 PCR 仪上按下表设置连接程序，热盖温度设为 50℃。

热盖温度 50 ℃	反应体积 50 µL	
步骤	温度	时间
1	37℃	30 min
2	4℃	保持

2. 室温解冻 10x Adapter Buffer 和 FFPE Adapter。涡旋混匀、短暂离心后置于冰上，并确保试剂完全解冻。
3. 按下表在冰上配制 Ligation Mix。按表中从上到下的顺序加入试剂，涡旋混匀、短暂离心后置于冰上。

Ligation Mix

组分	1 RXN（µL） × 1	2 RXNs（µL） × 2.2
10x Adapter Buffer	5	11
FFPE Adapter	5	11
无核酸酶水	37	81.4
FFPE Adapter Conjugator	1	2.2

RNase Inhibitor	2	4.4
总计	50	110

4. 将上述获得的细胞核在 4℃、850 × g 条件下离心 5 分钟。
5. 小心去除上清液，避免扰动细胞核沉淀，并置于冰上。
6. 用 50 µL Ligation Mix 上下吹打，轻柔重悬细胞核。
7. 置于 PCR 仪中并启动连接程序。
8. PCR 仪降至 4℃后，在 4℃、850 × g 条件下离心 5 分钟。
9. 小心去除上清液，避免扰动细胞核沉淀。
10. 用 200 µL 预冷 FFPE Nuclei Wash Buffer 轻柔重悬细胞核。
11. 4℃、850 × g 离心 5 分钟。
12. 小心去除上清液，避免扰动细胞核沉淀，并置于冰上。
13. 用 120 µL 预冷 FFPE Nuclei Wash Buffer 轻柔重悬细胞核。
14. 继续进行 SCOPE-chip 上样，或将细胞核在 −80℃下最多保存 48 小时。

8. SCOPE-chip 上样

8.1 SCOPE-chip 预润洗

准备材料:

- SCOPE-chip SD



用户自备:

- PBS
- 10% Tween-20
- 无水乙醇
- 适用于 SCOPE-chip 上样的 p200 吸头*

操作提示:

- 吸头宽度是芯片正确上样的关键。经验证可用于芯片上样的吸头包括：Eppendorf 货号 0030078551、Jet Biofil 货号 PMT231200、VWR 货号 732-3701 或 Rainin 货号 30389242。
- 不建议使用以下吸头：Rainin 货号 30389186、USA Scientific 货号 1071-1811。
- SCOPE-chip 上样时保持移液器垂直。

1. 如 SCOPE-chip 储存在 4℃，请先恢复至室温。
2. 按下表配制 PBST（含 0.1% v/v Tween-20 的 PBS），涡旋混匀并短暂离心。

PBST:

组分	1 RXN（μL）	2 RXNs（μL）
PBS	990	1960
10% Tween-20	10	40
总计	1000	2000

3. 使用 200 μL 移液器，经进样口向 SCOPE-chip 注入 200 μL 无水乙醇，在 10 秒内缓慢推注并避免引入气泡。

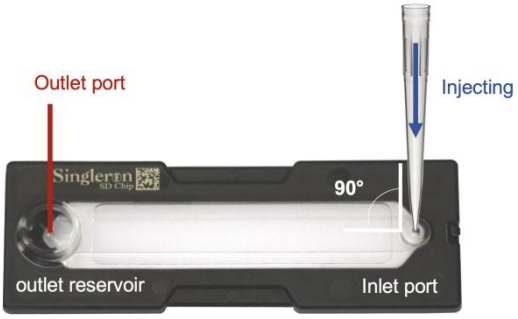


图 2：SCOPE-chip 进样口、出口储液槽和出液口的位置

4. 从出口储液槽中移除乙醇，不要接触出液口（直接在出液口抽吸可能会使空气进入 SCOPE-chip）。
5. 再用无水乙醇重复预润洗两次。
6. 经进样口向 SCOPE-chip 注入 200 µL PBST，在 10 秒内缓慢推注并避免引入气泡。
7. 从出口储液槽中移除液体，不要接触出液口。
8. 再用 PBST 重复预润洗两次。
9. 在出口储液槽中保留 50 – 100 µL PBST，确保空气不会进入芯片。
10. 盖好 SCOPE-chip 以防污染，并在室温下放置至“将细胞装载至 SCOPE-chip”步骤。

8.2 Barcode Beads V3 预处理

准备材料：

- Barcode Beads SD V3 (黑色)



用户自备：

- Janus 磁力架（新格元 货号 1120020202）或等效产品
- PBS

1. 充分涡旋振荡 Barcode Beads V3 30 秒，直至完全重悬。
2. 每个反应吸取 900 µL Barcode Beads V3，加入新标记的 1.5 mL 管中。
3. 短暂离心，将管置于磁力架上直至液体澄清。
4. 弃去上清液，避免扰动磁珠。
5. 将管从磁力架上取下，用 1 mL PBS 重悬磁珠。
6. 短暂离心后，将管放回磁力架，直至液体澄清。
7. 弃去上清液，避免扰动磁珠。
8. 再用 1 mL PBS 洗涤两次。

9. 最后一次洗涤后，用 60 µL PBS 重悬磁珠。
10. 将 Barcode Beads V3 暂存于室温，供后续使用。

重要提示：如 1 小时内不使用，请将磁珠储存在 4℃。

8.3 裂解液配置



准备材料：

- FFPE Lysis Buffer, Stock (橙色)
- FFPE Lysis Enhancer (橙色)

1. 室温解冻 FFPE Lysis Buffer, Stock 和 FFPE Lysis Enhancer。涡旋混匀、短暂离心后置于冰上，并确保试剂完全解冻。
2. 按下表在冰上配制 FFPE Lysis Mix。涡旋混匀、短暂离心后置于冰上。

FFPE Lysis Mix:

组分	1 RXN（µL） ×1	2 RXNs（µL） ×2.2
FFPE Lysis Buffer, Stock	95	209
FFPE Lysis Enhancer	5	11
总计	100	220

8.4 细胞核重悬液准备



准备材料：

- RNase Inhibitor (绿色)
- 第 7.2 节获得的细胞核悬液

用户自备：

- 预冷 PBS（4℃）
- 10% Tween 20

1. 按下表在冰上配制 Nuclei Dilution Buffer。涡旋混匀、短暂离心后置于冰上。

Nuclei Dilution Buffer:

组分	1 RXN（µL） ×1	2 RXNs（µL） ×2.2

预冷 PBS	993	2 184.6
10% Tween 20	5	11
RNase Inhibitor	2	4.4
总计	1000	2200

2. 使用预冷的 Nuclei Dilution Buffer，按下表稀释细胞核悬液。

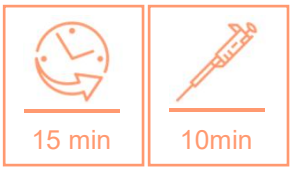
重要提示：装载到芯片上的细胞核中，只有一部分会被微孔捕获。若要在 SCOPE-chip SD 上捕获 10,000 个细胞核（左列），需装载 100 µL、浓度为 4.0 × 10^5 nuclei/mL 的悬液（右列），即共 40,000 个细胞核。

3. 立即进行 SCOPE-chip 细胞上样。

目标捕获细胞核数	建议细胞核浓度
8 000 – 10 000	（3.5 – 4.0）× 10^5 nuclei /mL
10 000 – 15 000	（4.0– 4.5）× 10^5 nuclei /mL
15 000 – 20 000	（4.5 – 5.0）× 10^5 nuclei /mL

8.5 将细胞核装载至 SCOPE-chip

准备材料: (可观看附录中视频)



- 预润洗后的 SCOPE-chip SD（来自第 8.1 节）

用户自备:

- 预冷 PBS（4℃）
- 用于 SCOPE-chip 上样的 p200 吸头（见第 8.1 节的建议）
- 稀释后的细胞核（来自上一节）

1. 取出已预润洗的 SCOPE-chip。如进样口附近有溢出液体，请将其移除。
2. 经进样口向 SCOPE-chip 缓慢注入 200 µL 预冷 PBS，在 10 秒内缓慢推注并避免引入气泡。
3. 再次移除出口储液槽中的液体，不要接触出液口。
4. 再重复一次 PBS 洗涤。
5. 上下吹打轻柔重悬稀释后的细胞核。经进样口向 SCOPE-chip 注入 100 µL 均一的细胞核悬液，在 30 秒内缓慢推注并避免引入气泡。

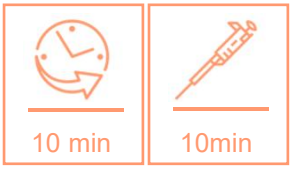
操作提示:

- SCOPE-chip 上样时保持移液器垂直。
- 推注细胞悬液用时少于 30 秒可能会降低细胞捕获数量。
- 推注细胞悬液用时超过 30 秒可能导致细胞在芯片入口处分布偏倚，从而提高 doublet 率。

6. 移除出口储液槽中的多余液体，不要接触出液口。注意：直接在出液口抽吸可能会带走 SCOPE-chip 中的细胞并引入气泡。
7. 将 SCOPE-chip 在室温静置 5 分钟，使细胞沉降至微孔中。
8. 在约 30 秒内经进样口缓慢注入 200 µL 预冷 PBS，避免引入气泡；移除出口储液槽中的多余液体，不要接触出液口。
9. 再进行一次 PBS 洗涤。在显微镜下观察微孔上方是否有漂浮细胞；如有，请重复 PBS 洗涤。
10. 使用显微镜检查细胞在微孔中的分布。理想情况下，5% – 15% 的微孔应含有细胞。如细胞占据的微孔少于 5%，请使用适量细胞重复步骤 5 – 9。

8.6 装载 Barcode Beads

准备材料:



- 含细胞核的 SCOPE-chip SD（来自上一步）
- 清洗后的 Barcode Beads（来自第 8.2 节）

用户自备:

- 预冷 PBS（4℃）
- 用于 SCOPE-chip 上样的 p200 吸头（见第 4.1 节的建议）

1. 上下吹打重悬预先制备的 Barcode Beads。
2. 立即经进样口向 SCOPE-chip 加入 60 µL Barcode Beads 悬液，在 30 秒内缓慢推注，然后孵育 1 分钟。
3. 经进样口注入 100 µL 预冷 PBS，在 30 秒内缓慢推注，使磁珠在芯片内充分铺开。
4. 经进样口向 SCOPE-chip 注入 200 µL 预冷 PBS，在约 30 秒内缓慢推注。
5. 将出口储液槽中的多余磁珠收集至新标记的 1.5 mL 管中，注意不要接触出液口。
6. 再用 200 µL 预冷 PBS 洗涤两次，以去除剩余的多余磁珠。
7. 在显微镜下检查芯片中的磁珠分布，至少 95% 的微孔应被磁珠占据。

重要提示:
如磁珠占据的微孔少于 95%，使用步骤 5 收集的磁珠重新装载 SCOPE-chip：

1. 将回收的磁珠置于磁力架上并去除上清液。
2. 用 30 µL PBS 重悬磁珠。
3. 按上述步骤 2 – 7 将磁珠注入 SCOPE-chip。
   如出口储液槽附近存在较多空孔，也可从出液口注入回收的磁珠。

8.7 细胞核裂解与 mRNA 捕获

准备材料:



- 已装载细胞核的 SCOPE-chip SD（来自上一步）
- FFPE Lysis Mix (from Section 8.1)

用户自备:

- 用于 SCOPE-chip 上样的 p200 吸头（见第 4.1 节的建议）

1. 经进样口向 SCOPE-chip 注入 100 µL 配制好的 FFPE Lysis Mix，在 30 秒内缓慢推注并避免引入气泡。
2. 移除出口储液槽中的多余液体，避免接触出液口。
3. 将 SCOPE-chip 在室温孵育 20 分钟，使细胞裂解并使核酸与 Barcode Beads 结合。
4. 立即进行 Barcode Beads 回收步骤。

8.8 Barcode Beads 回收

准备材料:



- 已完成上样的 SCOPE-chip SD（来自上一步）
- Janus 磁力架（新格元 货号 1120020202）或等效产品
- Singleron Magnetic Rack
- 预冷 Wash Buffer A（4℃，瓶装）

用户自备:

- 用于 SCOPE-chip 上样的 p200 吸头（见第 4.1 节的建议）

1. 向出口储液槽加入 200 µL 预冷 Wash Buffer A 以去除杂质；避免接触出液口，且不要向芯片内注液。
2. 移除出口储液槽中的液体，不要接触出液口。
3. 再重复步骤 2 和 3 两次，彻底清洗储液槽。
4. 将 Singleron Magnetic Rack 放在 SCOPE-chip 上方，室温孵育 1 分钟。
5. 向出口储液槽加入 200 µL 预冷 Wash Buffer A，不要接触出液口（不要向芯片内注液）。

6. 经进样口吸取 200 µL 含有已结合 mRNA 的 Barcode Beads 液体。



图 3：通过进样口回收 Barcode Beads

7. 将收集的 Barcode Beads 转移至新标记的 2.0 mL 管中，并置于冰上。
8. 再重复步骤 5–7 两次，以回收大部分 Barcode Beads。
9. 立即进行第二链合成与 cDNA 扩增。

9. 第二链合成与 cDNA 扩增

9.1 第二链合成



准备材料:

- 预冷 Wash Buffer A（4℃，瓶装）
- 预冷 Wash Buffer B（4℃，白色）
- 10x Extension Buffer (浅紫色)
- dNTP Mix (浅紫色)
- Extension Enzyme (浅紫色)
- Barcode Beads（来自上一步）

用户自备:

- 无核酸酶水
- Janus 磁力架（新格元 货号 1120020202）或等效产品

1. 在金属浴上按下表设置第二链合成程序。

	反应体积 100 µL	
温度	时间	振荡
25℃	10 min	900 rpm
37℃	30 min	900 rpm
75℃	10 min	可选*
4℃	保持	–

* 如无法立即进行 cDNA 扩增反应，请在 75℃孵育 10 分钟。

2. 室温解冻 10x Extension Buffer 和 dNTP Mix。涡旋 10 秒、短暂离心后置于冰上，并确保试剂完全解冻。

3. 按下表在冰上配制 Second-Strand Synthesis Mix。按表中从上到下的顺序加入试剂，涡旋混匀、短暂离心后置于冰上。

Second-Strand Synthesis Mix:

组分	1 RXN（µL） × 1	2 RXNs（µL） × 2.2
10x Extension Buffer	10	22
预冷的无核酸酶水	85	187
dNTP Mix	2.5	5.5
Extension Enzyme	2.5	5.5
总计	100	220

4. 将先前从 SCOPE-chip 回收的磁珠管短暂离心。
5. 将离心管置于磁力架上，孵育直至上清液澄清。
6. 小心弃去上清液，避免扰动磁珠。
7. 将管从磁力架上取下，加入 1 mL 预冷 Wash Buffer A，上下吹打充分混匀。
8. 短暂离心后将管放回磁力架，静置至上清液澄清。
9. 小心弃去上清液，避免扰动磁珠，然后将管从磁力架上取下。
10. 加入 500 µL 预冷 Wash Buffer B，上下吹打充分混匀。
11. 短暂离心后将管放回磁力架，静置至上清液澄清。
12. 小心弃去上清液，避免扰动磁珠。
13. 短暂离心后将管放回磁力架，使用细吸头去除所有残余缓冲液。
14. 将管从磁力架上取下，加入 100 µL Second-Strand Synthesis Mix。
15. 轻柔上下吹打，使磁珠均匀分散。
16. 将管置于预热的金属浴中并启动第二链合成程序。
17. 继续进行 cDNA 扩增。

9.2 cDNA 扩增



准备材料:

- Amplification Master Mix (透明)
- FFPE Primer Mix (透明)
- Amplification Enzyme (透明)
- 第二链合成产物（来自上一步）

用户自备:

- 无核酸酶水
- Janus 磁力架 (Singleron 货号 1120020202) 或等效产品

1. 在 PCR 仪上按下表设置 cDNA 扩增程序，热盖温度设为 105 ℃。

热盖温度 105° C	反应体积 50 µL	
步骤	温度	时间
1	95℃	3 min
	98℃	20 sec
2	65℃	45 sec

循环数 = 4	72℃	90 sec
3 循环数 = 8	98℃	20 sec
	67℃	20 sec
	72℃	90 sec
4	72℃	5 min
5	4℃	保持

2. 室温解冻 Amplification Master Mix 和 FFPE Primer Mix。涡旋混匀、短暂离心后置于冰上，并确保试剂完全解冻。
3. 按下表在冰上配制 PCR Mix。按表中从上到下的顺序加入试剂，涡旋混匀、短暂离心后置于冰上。

PCR Mix:

组分	1 RXN（μL） ×1	2 RXNs（μL） ×2.2
Amplification Master Mix	172	378.4
FFPE Primer Mix	32	70.4
预冷的无核酸酶水	188	413.6
Amplification Enzyme	8	17.6
总计	400	880

4. 将第二链合成产物短暂离心并置于磁力架上。
5. 静置至上清液澄清，然后小心弃去上清液，避免扰动磁珠。
6. 短暂离心后将离心管放回磁力架，使用细吸头去除所有残余液体。
7. 将离心管从磁力架上取下，加入 400 μL PCR Mix，上下吹打充分混匀。
8. 将混合物均匀分配到标记好的八联排 PCR 管中，每管加入 50 μLPCR 混合液（含磁珠）。盖紧八联排 PCR 管的管盖。

重要提示：以下步骤应在 post-PCR 工作区进行。

9. 将八联排 PCR 管置于预热的 PCR 仪中，启动 cDNA 扩增程序。
10. PCR 仪降至 4℃后，cDNA 可在 4℃保存 48 小时，或在 -20℃保存最长一周。

9.3 cDNA 纯化

准备材料:

- 扩增后的 cDNA（来自上一步）
- 0.9× Purification Beads Wash Buffer (白色)



用户自备：

- 无水乙醇
- 无核酸酶水
- 洗脱缓冲液（10 mM Tris-HCl pH 8.5）
- AMPure XP
- Janus 磁力架（新格元 货号 1120020202）或等效产品

重要提示：

- 使用前充分涡旋混匀 AMPure XP beads。
- 取约 1 mL AMPure XP beads，室温放置 30 分钟或直至恢复至室温。
- 缓慢吸取 AMPure XP beads，以确保取液体积准确。

1. 每个反应制备 2 mL 80%乙醇。现配现用以获得最佳结果。
2. 将八联排 PCR 管中扩增后的 cDNA 合并至已标记的 1.5 mL 管中。
3. 短暂离心，并使用移液器测量体积。
4. 按扩增 cDNA 总体积的 0.9× 计算 AMPure XP beads 体积（例如，测得产物体积为 400 µL，则使用 0.9 × 400 µL = 360 µL AMPure XP beads）。
5. 涡旋混匀 AMPure beads，取计算所得体积加入扩增 cDNA 管中。
6. 涡旋 30 秒充分混匀，室温孵育 5 分钟。
7. 短暂离心，将管置于磁力架上 5 分钟或直至液体澄清。



图 5：使用 Janus 磁力架 进行 AMPure XP beads 纯化

8. 小心弃去上清液，避免扰动磁珠。
9. 将管从磁力架上取下，加入 400 µL 0.9× Purification Beads Wash Buffer。
10. 涡旋 30 秒充分混匀，室温孵育 5 分钟。
11. 短暂离心，将管置于磁力架上 5 分钟或直至液体澄清。
12. 小心弃去上清液，避免扰动磁珠。
13. 保持管位于磁力架上，加入 800 µL 80%乙醇 洗涤磁珠。
14. 室温孵育 30 秒，小心弃去上清液，避免扰动磁珠。

15. 再重复一次 80%乙醇洗涤。
16. 短暂离心后，将管放回磁力架。
17. 使用细吸头去除所有残余乙醇。
18. 保持管盖打开，使磁珠干燥约 2 分钟或直至不再发亮（不超过 5 分钟）。
19. 将管从磁力架上取下，加入 20 µL 洗脱缓冲液，涡旋混匀。
20. 室温孵育 5 分钟，短暂离心后放回磁力架，直至液体澄清。
21. 将含纯化 cDNA 的上清液转移至新标记的 1.5 mL 管中。
22. cDNA 可在 4℃保存 72 小时，或在 −20℃保存最长 3 个月。

9.4 cDNA 质控

准备材料:



- 纯化后的 cDNA（来自上一步）

用户自备:

- Qubit 4 荧光计 或等效产品
- Qubit Assay Tubes 和 Qubit 1x dsDNA HS assay kit
- Agilent Fragment Analyzer 5200 (Agilent 货号 M5310AA) 或等效产品
- Agilent Fragment Analyzer DNA/NGS kit (Agilent 货号 DNF-474-0500) 或等效产品

1. 取 1 µL cDNA，使用 Qubit 4 荧光计 测定浓度。
2. 取 cDNA（2–5 ng/µL），使用 Agilent Fragment Analyzer 5200 检测片段大小分布。
3. 理想的 cDNA 应满足以下标准:
   a) cDNA 总量应 >30ng 。
   b) 主峰应位于 170–350 bp;
   c) 150–450 bp 片段应占总分子数的 50% 以上。
   d) 小于 150 bp 的片段应占总分子数的 20% 以下。

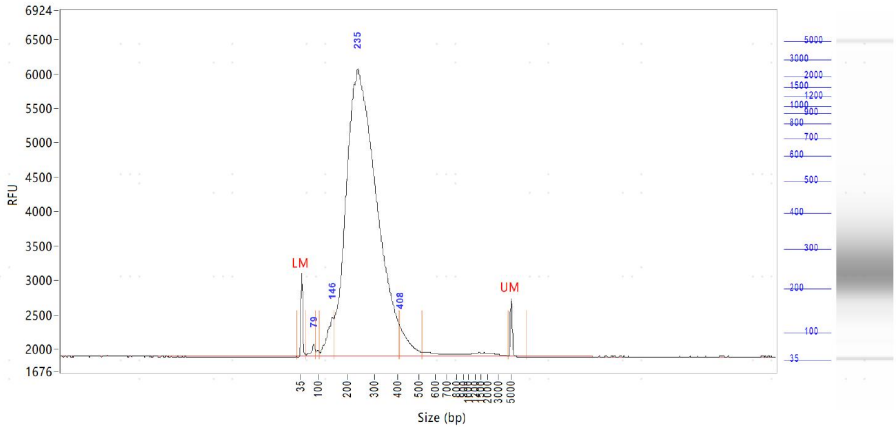


图 6：使用 Agilent Fragment Analyzer 5200 进行 cDNA 质控。

10. 文库制备

10.1 文库制备与加索引



准备材料：

- Library Amp Mix v2 (白色)
- 纯化后的扩增 cDNA（来自上一步）

用户自备：

- 无核酸酶水

1. 在 PCR 仪上，根据下表设置文库 index 标记程序。热盖温度应设为 105℃。

热盖温度 105℃	反应体积 50 µL	
步骤	温度	时间
1	98℃	30 sec
2 循环数 = 6	98℃	10 sec
	65℃	75 sec
3	65℃	5 min
4	4℃	保持

2. 在冰上解冻 Library Amp Mix v2 和 Unique Dual Indexes。涡旋混匀、短暂离心后置于冰上，并确保试剂完全解冻。

3. 在冰上按下表顺序加入以下试剂：

组分	体积（µL）
Purified cDNA (20 ng)	可变
Library Amp Mix v2	25
Unique Dual Indexes*	10
无核酸酶水	可变
总计	50

** 每个样本选择不同的 UDI Adapter。请采用 Illumina 推荐的混库策略；NovaSeq X / X Plus 相关内容见附录。*

4. 上下吹打混匀并短暂离心。
5. 将反应管置于预热的 PCR 仪中，运行文库加索引程序。

6. PCR 仪降至 4℃后，立即进行扩增文库的纯化和片段筛选。

10.2 文库纯化



准备材料：

- 扩增并加索引的文库（来自上一步）

用户自备：

- 无水乙醇
- 无核酸酶水
- 洗脱缓冲液（10 mM Tris-HCl pH 8.5）
- AMPure XP 纯化磁珠
- Janus 磁力架（新格元 货号 1120020202) or 或等效产品

重要提示：

- 使用前充分涡旋混匀 AMPure XP beads。
- 取约 1 mL AMPure XP beads，室温放置 30 分钟或直至恢复至室温。
- 缓慢吸取 AMPure XP beads，以确保取液体积准确。

1. 每个反应配制 0.5 mL 80% 乙醇；为获得最佳结果，请现用现配。
2. 短暂离心，并使用移液器测量体积。
3. 按扩增 cDNA 总体积的 0.9× 计算 AMPure XP beads 体积（例如，测得产物体积为 50 µL，则使用 0.9 × 50 µL = 45 µL AMPure XP beads）。
4. 涡旋混匀 AMPure beads，取计算所得体积加入扩增 cDNA 管中。
5. 涡旋 30 秒充分混匀，室温孵育 5 分钟。
6. 短暂离心，将管置于磁力架上 5 分钟或直至液体澄清。
7. 小心弃去上清液，避免扰动磁珠。
8. 将管从磁力架上取下，加入 100 µL 0.9× Purification Beads Wash Buffer。
9. 涡旋 30 秒充分混匀，室温孵育 5 分钟。
10. 短暂离心，将管置于磁力架上 5 分钟或直至液体澄清。
11. 小心弃去上清液，避免扰动磁珠。
12. 保持管位于磁力架上，加入 200 µL 80%乙醇 洗涤磁珠。
13. 室温孵育 30 秒，小心弃去上清液，避免扰动磁珠。
14. 再重复一次 80% 乙醇洗涤。
15. 短暂离心后，将管放回磁力架。
16. 使用细吸头去除所有残余乙醇。

17. 保持管盖打开，使磁珠干燥约 2 分钟或直至不再发亮（不超过 5 分钟）。
18. 将管从磁力架上取下，加入 20 µL 洗脱缓冲液，涡旋混匀。
19. 室温孵育 5 分钟，短暂离心后放回磁力架，直至液体澄清。
20. 将含纯化文库的上清液转移至新标记的 1.5 mL 管中。
21. 文库可在 4℃保存 72 小时，或在 −20℃保存最长 3 个月。

10.3 文库质控

准备材料:



- 纯化后的 cDNA（来自上一步）

用户自备:

- Qubit 4 荧光计、Qubit 检测管 和 Qubit 1x dsDNA HS 检测试剂盒
- Agilent Fragment Analyzer 5200 (Agilent 货号 M5310AA) 或等效产品
- Agilent Fragment Analyzer DNA/NGS 试剂盒（Agilent 货号 DNF-474-0500）或等效产品

1. 取 1 µL 文库，使用 Qubit 4 荧光计 测定浓度。

2. 取文库（2 - 5 ng/µL），使用 Agilent Fragment Analyzer 5200 检测片段大小分布。

3. 理想的 cDNA 应满足以下标准:

   a) 文库产量应 >100 ng。
   b) 主峰应位于 220 - 350 bp;
   c) 大于 500 bp 的片段应占总分子数的 10% 以下。
   d) 小于 200 bp 的片段应占总分子数的 10% 以下。

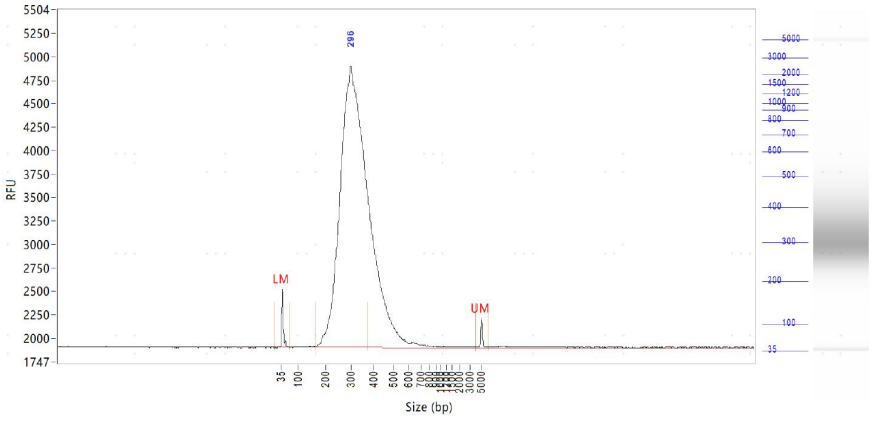


图 7：使用 Agilent Fragment Analyzer 5200 进行文库质控

附录 A：SCOPE-chip 操作视频

可通过以下链接查看 SCOPE-chip 细胞上样操作视频：

https://www.bilibili.com/video/BV1tctF6SE54/

可通过以下链接查看 SCOPE-chip Barcode Beads 上样操作视频：

https://www.bilibili.com/video/BV14ctF6SEgk/

可通过以下链接查看 Barcode Beads 回收操作视频：

https://www.bilibili.com/video/BV14ctF6SEuW/

附录 B：测序

测序文库

本试剂盒生成以 P5 起始、以 P7 终止的标准 Illumina 双端文库结构。桥式扩增过程中使用的标准 Illumina 测序序列。文库还含有 8 碱基的 i5 和 i7 样本索引序列（见下表“样本表中的索引序列”）。在 Read1 测序引物结合位点旁可找到细胞 barcode（由 27 个碱基的特异序列及 linker 组成）和 12 碱基 UMI。Read2 用于解析不同的转录 RNA 序列（mRNA、lncRNA、miRNA 等）。对这些文库进行测序可生成标准 Illumina FASTQ 文件。

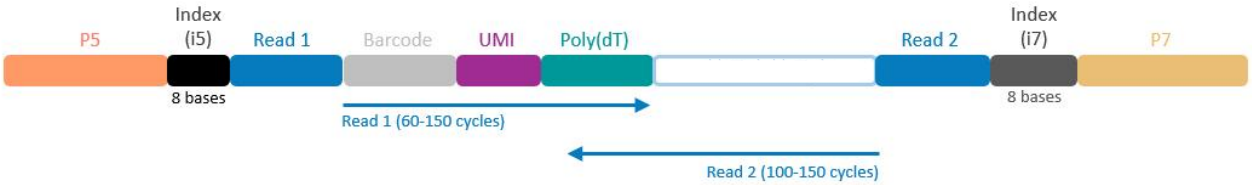


图 8：测序文库结构示意图。

Illumina 测序仪兼容性

新格元生物科技已验证下列测序仪的兼容性。测序仪的选择可能影响实验性能；有关性能差异的更多信息，请访问新格元生物科技支持网站。

- NovaSeq 6000
- NovaSeq X / X Plus

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）