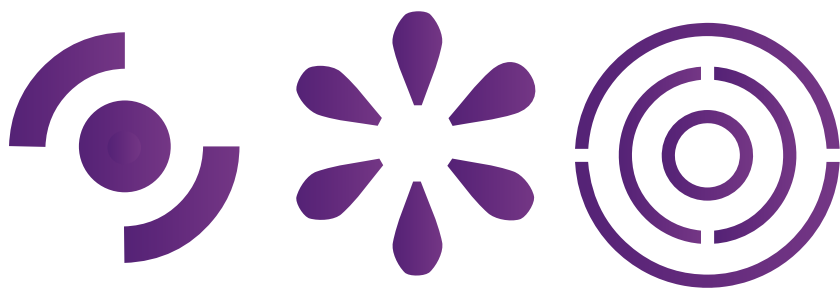


Stereo-seq 建库试剂盒 使用说明书



货号：101KL114 (4 RXNs)

试剂盒版本号：V1.0

说明书版本号：B1

版本历史

说明书版本： A0
试剂盒版本： V 1.0
修订日期： 2021 年 7 月
描述： 首次发布

说明书版本： B
试剂盒版本： V 1.0
修订日期： 2023 年 11 月
描述：

- 从“Stereo-seq 转录组试剂套装（载体版）使用说明书”中分离成为独立说明书。
- 变更运输方式，由“干冰运输”改为“冷链运输”
- 新增Stereo-seq 16 Barcode 扩增试剂盒。
- 格式勘误。

说明书版本： B1
试剂盒版本： V 1.0
修订日期： 2023 年 11 月
描述：

- 修正了Stereo-seq建库试剂盒部分组分的货号。
- 修正了16 Barcode 扩增试剂盒中PCR Amplification Mix试剂的管盖颜色。
- 打断产物扩增PCR Mix部分试剂的单个反应体积勘误。

提示：请下载最新版说明书，与相应版本的试剂盒使用。

© 法律声明。

2023 深圳华大生命科学研究院保留所有权利。

1. 本产品仅用于研究，不用于诊断。
2. 本手册上的内容可能全部或部分受到适用的知识产权法的保护。深圳华大生命科学研究院和 / 或相应权利主体依法拥有其知识产权，包括但不限于商标权、版权等。
3. 深圳华大生命科学研究院不授予或暗示使用我们或任何第三方的任何版权内容或商标（注册或未注册）的权利或许可。未经本单位书面同意，任何人不得擅自使用、修改、复制、公开传播、更改、分发或发布本手册的程序或内容，不得使用或利用设计技巧使用或占有本单位或本单位关联方的商标、标识或其他专有信息（包括图像、文本、网页设计或形式）。
4. 此处的任何内容都无意于或应被理解为对此处列出或描述的任何产品的性能的任何保证、表达或暗示。适用于本文所列任何产品的任何和所有保证均载于购买该产品所附的适用销售条款和条件。深圳华大生命科学研究院不做任何保证，并在此声明对本文所述任何第三方产品或协议的使用不做任何保证。

目录



第一章 产品介绍

1.1. 产品描述	2
1.2. 测序指南	2
1.3. 产品组成	2
1.4. 需自备物料清单	5
1.5. 注意事项	6

第二章 文库构建

2.1. 实验前准备	8
2.2. cDNA 打断与扩增	8
2.3. PCR 产物双选	10

第三章 文库结构和测序

3.1. 文库结构	12
3.2. 适配测序仪	12
3.3. 文库测序类型	12

附录

附录 A PCR Barcode Primer Mix 使用规则	13
附录 B 16 Barcode Primer Mix 使用规则	14



提示：额外的操作提示和指导。



关键步骤：特别注意这些步骤，以避免实验失败或不好的结果。



质量检查点



注意：特别注意；操作不当或疏忽可能导致实验失败。

01

产品介绍



1.1. 产品描述

STOmics® Stereo-seq 建库试剂盒可用于由时空 cDNA 扩增产物构建全转录本 3' 端文库，实现 DNA 打断，加测序接头。时空 cDNA 扩增产物的获得采用的是 Stereo-seq 时空转录组技术，是一种基于 DNBSEQ 高通量测序技术开发的、具有高分辨大视场特点的原位全转录组信息捕获技术。STOmics® Stereo-seq 建库试剂盒还可以搭配 Stereo-seq 16 Barcode 扩增试剂盒使用，16 Barcode 扩增试剂盒含有 16 种不同 Barcode，可支持多达 16 个样本混合测序。

本试剂盒中提供的所有试剂都经过严格的质量控制和功能验证，最大程度上保证了文库制备的稳定性和重复性。

1.2. 测序指南

使用本产品构建的测序文库可使用 DNBSEQ 测序平台进行测序。详情请参考本手册第三章。

1.3. 产品组成

- Stereo-seq 建库试剂盒 *1 (4 RXN)



- (可选，需单独订购) Stereo-seq 16 Barcode 扩增试剂盒 *1 (16 RXN)

* 关于产品货号、试剂组分等进一步信息见表格 1-1 至表格 1-2。

收到产品后




- 请尽快将产品按照指定条件保存。若转移时间较长，建议使用控温容器运输。
- 若发现冷链箱温度异常，可要求物流方现场打印温度实时监控记录表；签收后也可联系当地科研合作代表，以查询相关记录。
- 当运输条件、储存条件及使用方式都正确时，所有组分在有效期内均能保持完整活性。

表格 1-1 建库试剂盒的组分信息

试剂盒种类	组分信息	货号	管盖颜色	规格及数量	
Stereo-seq 建库试剂盒 货号： 101KL114	TME	1000028515	○	4 μL/支 × 1 支	
	Stop Buffer	1000028516	○	40 μL/支 × 1 支	
	TMB	1000028517	○	40 μL/支 × 1 支	
	PCR Amplification Mix	1000028519	●	400 μL/支 × 1 支	
	PCR Barcode Primer Mix (Barcode 57~64)	1000029088	●	50 μL/支 × 1 支	
	PCR Barcode Primer Mix (Barcode 81~88)	1000029089	●	50 μL/支 × 1 支	
	PCR Barcode Primer Mix (Barcode 89~96)	1000029180	●	50 μL/支 × 1 支	
	PCR Barcode Primer Mix (Barcode 97~104)	1000029181	●	50 μL/支 × 1 支	
	 储存温度：-25°C ~ -18°C  冷链运输  有效期：见标签				

表格1-2 16 Barcode 扩增试剂盒的组分信息

试剂盒种类	组分信息	货号	管盖颜色	规格及数量
Stereo-seq 16 Barcode 扩增试剂盒 货号： 101KB016	PCR Barcode Primer Mix1	1000043201	●	25 μL/支 × 1 支
	PCR Barcode Primer Mix2	1000043202	●	25 μL/支 × 1 支
	PCR Barcode Primer Mix3	1000043203	●	25 μL/支 × 1 支
	PCR Barcode Primer Mix4	1000043204	●	25 μL/支 × 1 支
	PCR Barcode Primer Mix5	1000043205	●	25 μL/支 × 1 支
	PCR Barcode Primer Mix6	1000043206	●	25 μL/支 × 1 支
	PCR Barcode Primer Mix7	1000043207	●	25 μL/支 × 1 支
	PCR Barcode Primer Mix8	1000043208	●	25 μL/支 × 1 支
	PCR Barcode Primer Mix9	1000043209	●	25 μL/支 × 1 支
	PCR Barcode Primer Mix10	1000043210	●	25 μL/支 × 1 支
	PCR Barcode Primer Mix11	1000043211	●	25 μL/支 × 1 支
	PCR Barcode Primer Mix12	1000043212	●	25 μL/支 × 1 支
	PCR Barcode Primer Mix13	1000043213	●	25 μL/支 × 1 支
	PCR Barcode Primer Mix14	1000043214	●	25 μL/支 × 1 支
	PCR Barcode Primer Mix15	1000043215	●	25 μL/支 × 1 支
	PCR Barcode Primer Mix16	1000043216	●	25 μL/支 × 1 支
	PCR Amplification Mix	1000043217	●	800 μL/支 × 1 支

 储存温度：-25°C ~ -18°C
  冷链运输
  有效期：见标签



此试剂盒不包含 TME、Stop Buffer、TMB 等试剂，如用于新鲜样本的文库构建，请搭配“Stereo-seq 建库试剂盒（4 RXN，货号：101KL114）”使用。

1.4. 需自备物料清单

此清单列出了本实验所需的设备和物料。表 1-3 不包括标准实验室设备，如制冰机、生物安全柜、pH 计、冰箱等。

表格 1-3 自备物料推荐

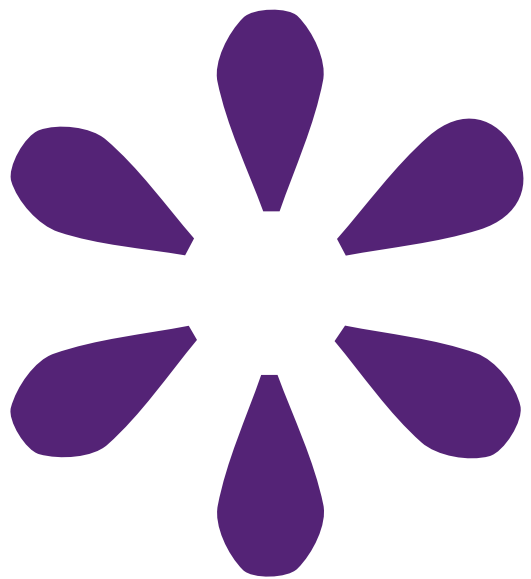
仪器
PCR 仪
漩涡混匀仪
NEBNext® Magnetic Separation Rack (NEB, Cat. No.S1515S)
1.5-2 mL 管磁力架 (Thermo Fisher, Cat. No. 12321D)
Qubit® 3.0 荧光定量仪 (Thermo Fisher, Cat. No. Q33216) 或同等功能仪器
Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Cat. No. G2939AA) 或同等功能仪器
试剂
Nuclease Free Water (NF water) (Ambion, Cat. No. AM9937)
1X TE Buffer , pH 8.0 (Ambion, Cat. No. AM9858)
无水乙醇 (分析纯)
AMPure® XP (Agencourt, Cat. No. A63882)
SPRIselect (Beckman Coulter, Cat. No. B23317/B23318/B23319)
VAHTS DNA Clean Beads (VAZYME, Cat. No. N411-02)
(三种磁珠任选一种)
Qubit dsDNA HS Assay Kit (Invitrogen, Cat. No. Q32854)
安捷伦高灵敏度 DNA 分析试剂盒 (Agilent, Cat. No. 5067-4626)
耗材
1.5 mL 离心管
0.2 mL PCR 管 (Axygen, Cat. No. PCR-02-C) 或 96 孔板 (Axygen, Cat. No. PCR-96M2-HS-C)
10 μL、100 μL、200 μL、1000 μL 带滤芯吸头
Qubit Assay Tubes (Invitrogen, Cat. No. Q32856) 或 0.5 mL 透明薄壁管 (Axygen, Cat. No. PCR-05-C)

1.5. 注意事项

- 本产品仅适用于科研用途，不可用于临床诊断，使用前请仔细阅读本说明书。
- 实验前请熟悉需使用的各种仪器的注意事项并掌握其操作方法。
- 本说明书提供的实验流程是通用的，实际操作中可根据具体的实验设计、样本特征、测序应用和设备进行实验流程、反应参数的调整，以优化性能和效率。
- 推荐使用前将各试剂组分提前取出，将酶类组分瞬时离心后置于冰上备用，并将其他组分置于室温解冻。解冻后轻柔地上下颠倒数次使其充分混匀，瞬时离心后置于冰上备用。
- 为避免样本交叉污染，推荐使用带滤芯的吸头，吸取不同样本时请更换吸头。
- 推荐把 PCR 仪温度预热至反应温度。
- 应避免皮肤和眼睛直接接触样本及试剂，切勿吞咽样本及试剂，一旦发生意外请立即用大量清水冲洗并及时就医。
- 所有样本和各种废弃物均应按相关法规规定处理。

02

文库构建



2.1. 实验前准备



本实验用于稀释试剂的液体，除特殊说明外，均使用 Nuclease-Free Water。

准备试剂	准备流程	存储
80% 乙醇	无水乙醇稀释到 80%	室温 1 天
磁珠	提前取出平衡至室温	4 °C
10 倍稀释的 TME	用 TE buffer 将 1 μL 稀释至 10 μL	冰上 1 hr
不要一次稀释所有的TME，试剂盒提供的量至少可稀释4次。		
Stop Buffer	至少提前 30 min 将 Stop Buffer 取出至室温 平衡	室温 1 天

2.2. cDNA 打断与扩增

- 取 20 ng cDNA 扩增产物用于打断反应；
- 先用移液枪将稀释后的 TME 吹打混匀，按照表 2-1 准备打断 Mix 体系，瞬时离心后轻轻吹打混匀，全程置于冰上操作；

表格 2-1 打断 Mix

组分	单个反应体积
TMB	4 μL
10 倍稀释的 TME	1 μL
cDNA 产物	X μL
Nuclease-free Water	15-X μL
Total	20 μL



cDNA 产物投入量： $X(\mu\text{L}) = 20 \text{ ng} / \text{cDNA 浓度} (\text{ng}/\mu\text{L})$ 。



如 cDNA 产物投入量 X 不足 1 μL，请稀释后重新测定浓度，再按照以上公式计算投入量。例如，测得 cDNA 浓度为 120 ng/μL，经计算 cDNA 投入量约为 0.167 μL，不足 1 μL，则可先取出 1 μL cDNA 产物，使用 TE Buffer 稀释 10 倍，重新测定浓度后，再计算投入量。

c. 准备 PCR 仪，待模块开始升温，将反应管放入 PCR 仪进行反应。


表格 2-2 打断条件


温度	时间
60°C (热盖)	on
55°C	10 min
12°C	Hold

d. 反应结束后取出反应管，瞬时离心将反应液收集至管底。室温下每管加 5 μ L Stop Buffer，移液器吹打混匀，室温静置 **5 min** 终止反应；

e. 打断产物扩增：按照表格 2-3 配制 PCR Mix 体系；

表格 2-3 PCR Mix

组分	单个反应体积
上一步打断产物	25 μ L
PCR Barcode Primer Mix 	25 μ L
PCR Amplification Mix	50 μ L
Total	100 μL

 PCR Barcode Primer Mix选择：如单次上机测序混合的文库数为1-4个文库，可选择本试剂盒（货号：101KL114）自带的PCR Barcode Primer Mix，使用规则请参考“附录A”；如需混合更多文库（5-16个），请使用“Stereo-seq 16 Barcode 扩增试剂盒（货号：101KB016）”，使用规则请参考“附录B”。

f. 震荡混匀，瞬时离心后置于 PCR 仪中，参照如下反应程序进行扩增。

表格 2-4 PCR 扩增程序 (反应体系 100 μ L)

温度	时间	循环数
105°C 热盖	on	-
95°C	5 min	1
98°C	20 s	
58°C	20 s	13
72°C	30 s	
72°C	5 min	1
12°C	Hold	-

g. 取 1 μ L PCR 产物，用 Qubit dsDNA HS Kit 检测浓度并记录。

 浓度通常为 10-100 ng/ μ L。



2.3. PCR 产物双选

- a. 将上述 PCR 产物和室温平衡好的磁珠按照 1: 0.55 混合 (100 μ L PCR 产物、55 μ L 磁珠)，震荡混匀后室温孵育 **5 min**；
- b. 将上述反应 PCR 管瞬时离心后置于磁力架上，静置 **3 min**，液体澄清后将上清转移到新的 PCR 管；



保留上清。

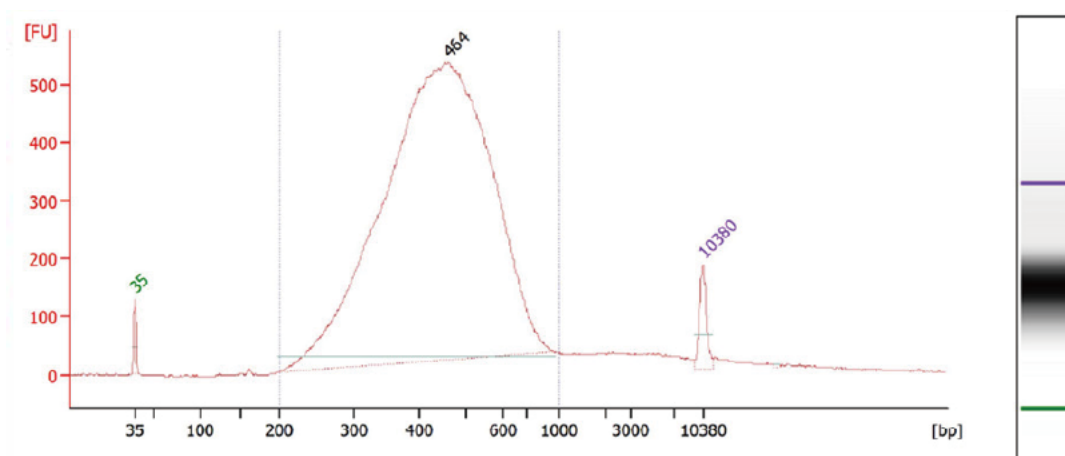
- c. 加 15 μ L 磁珠与上清混合，震荡混匀，室温孵育 **5 min**；
- d. 将离心管瞬时离心后置于磁力架上，静置 **3-5 min**，至液体澄清后用移液器小心吸取上清并弃掉；
- e. 将离心管保持在磁力架上，加入 200 μ L 新鲜配制的 80% 乙醇，通过旋转磁力架上的离心管来漂洗磁珠。静置 **30 s**，小心吸取并丢弃上清；
- f. 重复一次步骤 e；
- g. 尽量吸干管内液体。若有少量液体残留在管壁，可将离心管瞬时离心，在磁力架上分离后，用小量程的移液器将管底液体吸干；
- h. 室温下静置 **3-5 min** 风干磁珠，直至磁珠表面无反光、无开裂；
- i. 加 20 μ L 的 TE buffer 进行回溶，震荡混匀后室温静置 **5 min**，瞬时离心后置于磁力架上静置 **3 min**，待液体澄清后将上清转移到 1.5 mL 离心管内；

保留上清。

- j. 取 1 μ L 片筛产物，先用 Qubit dsDNA HS Kit 检测浓度并记录，再通过 Bioanalyzer、Tapestation (Agilent Technologies)、LabChip® GX、GXII、GX Touch (PerkinElmer)、Fragment Analyzer™ (Advanced Analytical) 等基于电泳分离原理的设备对 PCR 扩增产物进行片段分布检测。



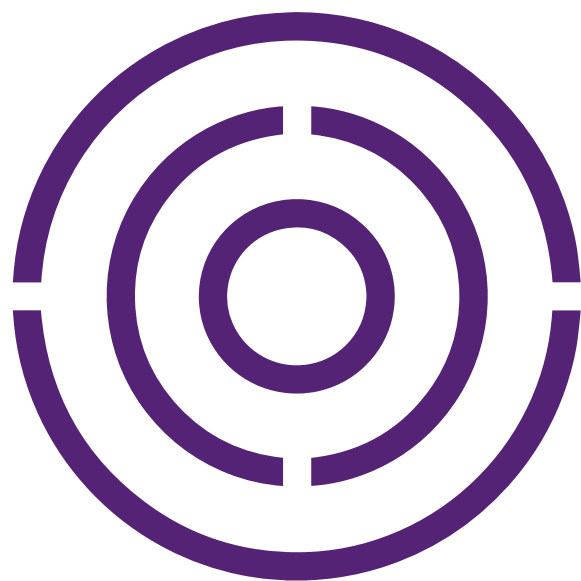
要求片段分布主峰在 200-600 bp (如图一)，纯化后产量通常大于 100 ng。



图一 . PCR 扩增产物 2100 峰图

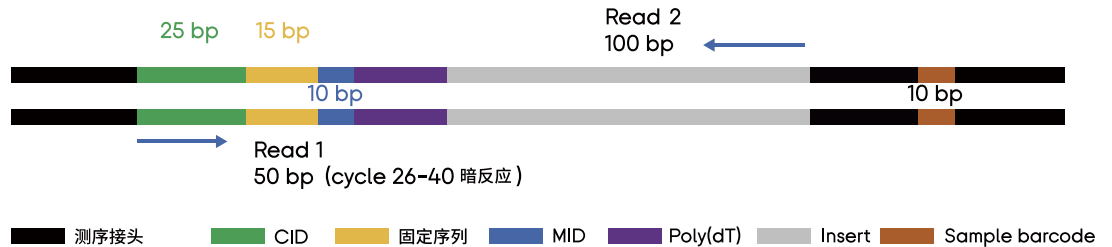
03

文库结构和测序



华大智造基因测序仪将为 Stereo-seq 文库提供测序支持。

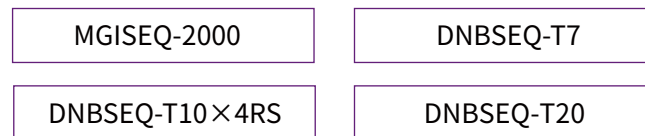
3.1. 文库结构



图二. 转录组文库结构

请参考试剂盒 [《940-000037-00, 高通量测序引物试剂盒 \(时空组学\)》](#) 说明书制备 DNB。

3.2. 适配测序仪



3.3. 文库测序类型

- 50 (read1) +100 (read2)
- 50 (read1) +100 (read2) +10 (Sample Barcode)



 一链暗反应, 26-40

测序前请仔细阅读对应的说明书, 并严格按照说明书的内容进行操作。如有任何测序疑问, 请您随时联系当地的华大智造客户经理或技术支持。

附录A: PCR Barcode Primer Mix使用规则

本试剂盒 PCR Barcode Primer Mix 是预先混合一组碱基平衡的 Barcode 组合，客户可随机挑选组合使用，建议使用两个及两个以上的样本进行拆分 Barcode 测序，只有一个样本上机时不拆分 Barcode 测序。附表1是每个预设的 PCR Barcode Primer Mix 包含的 Barcode 序列号。

附表1

PCR Barcode Primer Mix 名称	包含 barcode 序列号							
PCR Barcode Primer Mix (Barcode 57~64)	57	58	59	60	61	62	63	64
PCR Barcode Primer Mix (Barcode 81~88)	81	82	83	84	85	86	87	88
PCR Barcode Primer Mix (Barcode 89~96)	89	90	91	92	93	94	95	96
PCR Barcode Primer Mix (Barcode 97~104)	97	98	99	100	101	102	103	104

附录B: 16 Barcode Primer Mix使用规则

Stereo-seq 16 Barcode 扩增试剂盒可提供 16 种 PCR Barcode Primer Mix, 为满足大量文库批量化建库、多样本混合测序而研发。本试剂盒基于碱基平衡的设计原则, 经过反复实验测试, 挑选了最佳的 Barcode 组合, 可以搭配 Stereo-seq 建库试剂盒使用。为保证最佳效果, 使用时请仔细阅读下方使用规则。



如不同文库使用相同的Barcode组合, 则不能在同一条lane中测序。

基于碱基平衡的设计原则, 在使用时需将 PCR Barcode Primer Mix成组使用, 试剂盒中包含的 PCR Barcode Primer Mix 具备如下的分组规则:

4 个 PCR Barcode Primer Mix 成组: 1-4、5-8、9-12、13-16, 共计 4 组;

当每个样本数据量要求相同时, 不同样本数目可参考附表2所示的推荐 Barcode 组合方案:

附表 2

文库数/lane	方法 1	方法 2	方法 3	方法 4
1	1-4	5-8	9-12	13-16
2	样本 1: 1-2	样本 1: 5-6	样本 1: 9-10	样本 1: 13-14
	样本 2: 3-4	样本 2: 7-8	样本 2: 11-12	样本 2: 15-16
3	样本 1: 1	样本 1: 5	样本 1: 9	样本 1: 13
	样本 2: 2	样本 2: 6	样本 1: 10	样本 2: 14
	样本 3: 3-4	样本 3: 7-8	样本 1: 11-12	样本 3: 15-16
4	样本 1: 1	样本 1: 5	样本 1: 9	样本 1: 13
	样本 2: 2	样本 2: 6	样本 1: 10	样本 2: 14
	样本 3: 3	样本 3: 7	样本 1: 11	样本 3: 15
	样本 4: 4	样本 4: 8	样本 1: 12	样本 4: 16
5	样本 1: 1	样本 1: 5	样本 1: 9	样本 1: 13
	样本 2: 2	样本 2: 6	样本 1: 10	样本 2: 14
	样本 3: 3	样本 3: 7	样本 1: 11	样本 3: 15
	样本 4: 4	样本 4: 8	样本 1: 12	样本 4: 16
	样本 5: 任选其余三组中一组	样本 5: 任选其余三组中一组	样本 5: 任选其余三组中一组	样本 5: 任选其余三组中一组

文库数/lane	方法 1	方法 2	方法 3	方法 4
6	样本 1: 1	样本 1: 5	样本 1: 9	样本 1: 13
	样本 2: 2	样本 2: 6	样本 2: 10	样本 2: 14
	样本 3: 3	样本 3: 7	样本 3: 11	样本 3: 15
	样本 4: 4	样本 4: 8	样本 4: 12	样本 4: 16
	样本5和 任选其余 样本6: 三组中两组	样本5和 任选其余 样本6: 三组中两组	样本5和 任选其余 样本6: 三组中两组	样本5和 任选其余 样本6: 三组中两组
7	样本 1: 1	样本 1: 5	样本 1: 9	样本 1: 13
	样本 2: 2	样本 2: 6	样本 2: 10	样本 2: 14
	样本 3: 3	样本 3: 7	样本 3: 11	样本 3: 15
	样本 4: 4	样本 4: 8	样本 4: 12	样本 4: 16
	样本 参照 3 样本/lane 5-7: 选择组合 (避开 1-4)	样本 参照 3 样本/lane 5-7: 选择组合 (避开 5-8)	样本 参照 3 样本/lane 5-7: 选择组合 (避开 9-12)	样本 参照 3 样本/lane 5-7: 选择组合 (避开 13-16)
8	4 个 PCR Barcode Primer Mix 成对组合中任选两组			
9-16 (N, 混合文库总数)	分两步操作: 1. 文库 1-8分成1组, 采用上述8 文库数/lane方法添加 PCR Barcode Primer Mix。 2. 剩余文库分成1组, 根据剩余文库个数 (N-8), 参照上述1~8个文库/lane的方法, 按照对应要求使用不同组别的PCR Barcode Primer Mix。			



- ⚠ PCR Barcode Primer Mix 使用前必须先离心将液体聚集于管底, 轻柔地揭开管盖, 防止液体飞溅, 避免交叉污染; 使用时需用移液器吸打混匀液体; 使用完毕后需及时盖好管盖。
- ⚠ 不同 PCR Barcode Primer Mix 混合方法: 取等体积混合成 Mix 后加入样本中。例如 2 样本数 /lane (如 1-4, 将 1 和 2 等体积混合成 Mix 后加入样本 1 中, 将 3 和 4 等体积混合成 Mix 后加入样本 2 中)。

当文库数据量要求不相同, 需遵循在一条 lane 中数据量要求大于 20%的文库需使用成组的 PCR Barcode Primer Mix。例如有 9 个文库 pooling 于一条 lane 中, 其中有 1 个文库要求数据量为 30%, 此时需采用如下方案: 如其他8个文库分别使用PCR Barcode Primer Mix 1~8, 则这一个文库不可使用单一PCR Barcode Primer Mix, 而是要使用不重复且成组的PCR Barcode Primer Mix 9~12或13~16。