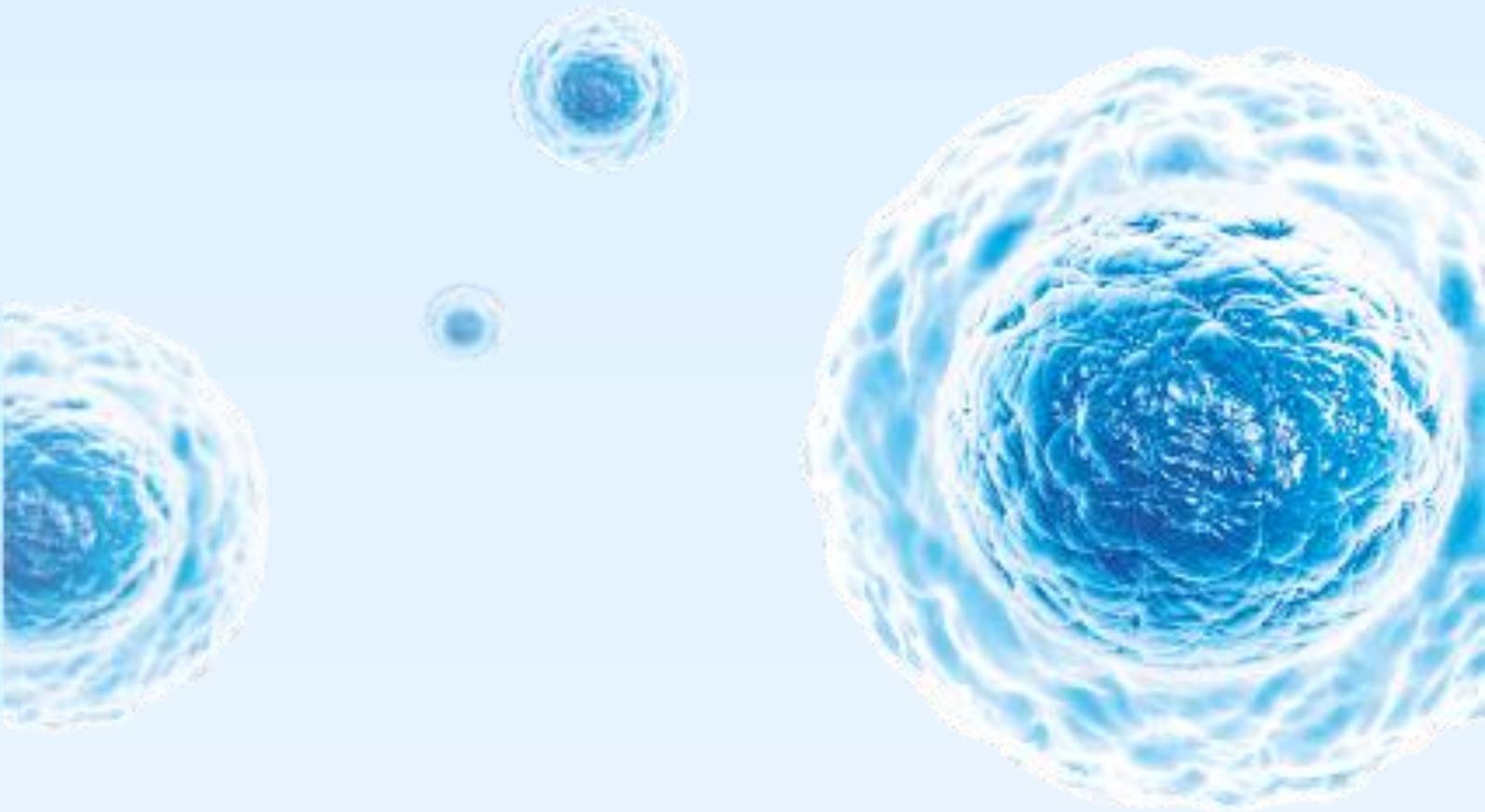


# Singleron



**GEXSCOPE<sup>®</sup> Single Cell RNA Library Kit V2**

**单细胞转录组建库试剂盒（SD/HD）用户手册·手动版**

本手册适用于以下产品:

目录号	产品名称	规格
4180011	GEXSCOPE® Single Cell RNA Library Kit Cell V2	2 RXNs
4180012	GEXSCOPE® Single Cell RNA Library Kit Cell V2	16 RXNs
4180031	GEXSCOPE® Single Cell RNA Library Kit Cell HD V2	2 RXNs
4180032	GEXSCOPE® Single Cell RNA Library Kit Cell HD V2	16 RXNs

### 历史版本信息

版本信息	修改内容
2021/11	1. 初版
2022/07	2. 新增测序策略的附录
2023/04	3. 新增补充说明

### 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

<b>1. 基本信息</b> .....	<b>- 1 -</b>
1.1 产品概述 .....	- 1 -
1.2 产品组成.....	- 2 -
<b>2. 自备仪器耗材试剂</b> .....	<b>- 6 -</b>
<b>3. 工作流程和操作时间</b> .....	<b>- 8 -</b>
<b>4. 实验准备</b> .....	<b>- 9 -</b>
4.1 微流控芯片准备 .....	- 9 -
4.2 Barcode Beads 准备 .....	- 10 -
<b>5. 单细胞分离和 mRNA 捕获</b> .....	<b>- 12 -</b>
5.1 Lysis Mix 准备.....	- 12 -
5.2 细胞悬液准备 .....	- 13 -
5.3 单细胞分离.....	- 14 -
5.4 注入 Barcode Beads .....	- 15 -
5.5 细胞裂解和 mRNA 捕获 .....	- 16 -
5.6 取出 Barcode Beads .....	- 16 -
<b>6. 反转录 cDNA 扩增</b> .....	<b>- 18 -</b>
6.1 反转录 .....	- 18 -
6.2 cDNA 扩增.....	- 19 -
6.3 cDNA 产物纯化.....	- 21 -

6.4 cDNA QC .....	- 23 -
<b>7. 转录组文库构建 .....</b>	<b>- 25 -</b>
7.1 片段化 .....	- 25 -
7.2 接头连接 .....	- 26 -
7.3 接头连接后产物纯化.....	- 27 -
7.4 PCR 富集 .....	- 29 -
7.5 扩增产物片段分选.....	- 29 -
7.6 文库质检.....	- 31 -
<b>附录 A 技术原理 .....</b>	<b>- 33 -</b>
单细胞分离和 mRNA 捕获、反转录及 PCR 富集原理 .....	- 33 -
cDNA 富集扩增原理 .....	- 34 -
转录组文库构建原理 .....	- 34 -
<b>附录 B 单细胞加载和分离 .....</b>	<b>- 36 -</b>
<b>附录 C Barcode Beads 加载.....</b>	<b>- 36 -</b>
<b>附录 D: Barcode Beads 取出和回收 .....</b>	<b>- 36 -</b>
<b>附录 E 测序.....</b>	<b>- 37 -</b>

## 1. 基本信息

### 1.1 产品概述

GEXSCOPE®单细胞转录组文库试剂盒将单细胞中含有的 mRNA 转化为 NGS 文库提供了完整的解决方案。

GEXSCOPE®单细胞转录组文库试剂盒使用 SCOPE-chip®, 一种带微孔的便携式微流控芯片。SCOPE-chip®集成了处理工作流程的多个步骤,如单细胞分离、细胞裂解和 polyA-RNA(包括 mRNA)的捕获。SCOPE-chip®使用方便, 无需特殊仪器即可操作。它适用于各种组织类型的细胞。

使用 sCelLiVE 组织分离试剂盒和 PythoN 仪器可以从组织中产生高质量单细胞悬浮液。见目录号 1190062, 11300602 和 11300603 了解更多信息。



## 1.2 产品组成

以下适用于 GEXSCOPE® Single Cell RNA Library Kit Cell V2 (2 RXNs) 和

GEXSCOPE® Single Cell RNA Library Kit Cell HD V2 (2 RXNs)

### Box 1: Single Cell RNA Amplification SD/HD & Library Reagents V2

收到试剂盒后, 请及时保存在-25~-15℃。

组分	SD		HD		管盖颜色
	数量	体积	数量	体积	
Lysis Buffer, Stock	1	1500 µL	1	1500 µL	绿色
RNase Inhibitor	1	50 µL	1	50 µL	绿色
100 mM DTT	1	400 µL	1	400 µL	绿色
RT Master Mix	1	400 µL	2	400 µL	紫色
Reverse Transcriptase	1	50 µL	2	50 µL	紫色
TS Primer	1	50 µL	1	50 µL	紫色
Amplification Master Mix	1	400 µL	2	400 µL	透明
A Primer Mix	1	200 µL	1	200 µL	透明
Amplification Enzyme	1	20 µL	2	20 µL	透明
Fragmentation Buffer	1	17 µL	1	17 µL	橙色
Fragmentation Enzyme Mix	1	6 µL	1	6 µL	橙色
1 × TE	1	800 µL	1	800 µL	橙色
Ligation Mix	1	72 µL	1	72 µL	蓝色
Ligation booster	1	4 µL	1	4 µL	蓝色
Adaptor	1	50 µL	1	50 µL	蓝色
Library Amp Mix v2	1	60 µL	1	60 µL	白色
Indexing Primer Mix1 (ATCACGTT)	1	30 µL	1	30 µL	白色
Indexing Primer Mix2 (CGATGTTT)	1	30 µL	1	30 µL	白色

**Box 2: SCOPE–chip SD/HD & Barcoding Beads V2**

收到试剂盒后，请及时保存在 2~8℃。

组分	SD		HD		管盖颜色
	数量	体积	数量	体积	
Barcode Beads SD	1	1.8 mL	–	–	黑色
Barcode Beads HD	–	–	1	1.8 mL	黑色
Wash Buffer A	1	7 mL	1	7 mL	白色
Wash Buffer B	1	1.8 mL	1	1.8 mL	白色
Singleron Magnetic Rack	1	–	1	–	–
SCOPE–chip SD	2	–	–	–	–
SCOPE–chip HD	–	–	2	–	–



以下适用于 GEXSCOPE® Single Cell RNA Library Kit Cell V2 (16 RXNs) 和

GEXSCOPE® Single Cell RNA Library Kit Cell HD V2 (16 RXNs)

### Box 1: SCOPE-chip SD/HD V2

收到试剂盒后，请及时保存在 2~35℃。

组分	SD	HD
	数量	数量
SCOPE-chip SD	16	-
SCOPE-chip HD	-	16
Singleron Magnetic Rack	4	4

### Box 2: Barcoding Beads SD V2 or Barcoding Beads HD V2

收到试剂盒后，请及时保存在 2~8℃。

组分	SD		HD		管盖颜色
	数量	体积	数量	体积	
Barcode Beads SD	8	1.8 mL	-	-	黑色
Barcode Beads HD	-	-	8	1.8 mL	黑色
Wash Buffer A	8	7 mL	8	7 mL	白色
Wash Buffer B	6	1.8 mL	6	1.8 mL	白色

### Box 3: Single Cell Amplification Reagents SD V2 or

### Single Cell Amplification Reagents HD V2

收到试剂盒后，请及时保存在-25~-15℃。

组分	SD		HD		管盖颜色
	数量	体积	数量	体积	
Lysis Buffer, Stock	2	1500 µL	2	1500 µL	绿色
RNase Inhibitor	1	300 µL	1	300 µL	绿色
100 mM DTT	1	400 µL	1	400 µL	绿色
RT Master Mix	2	1500 µL	4	1500 µL	紫色
Reverse Transcriptase	1	400 µL	2	400 µL	紫色
TS Primer	1	250 µL	2	250 µL	紫色
Amplification Master Mix	2	1600 µL	4	1600 µL	透明
A Primer Mix	1	750 µL	2	750 µL	透明
Amplification Enzyme	1	160 µL	2	160 µL	透明

**Box 4: Library Prep Reagents V2**

收到试剂盒后，请及时保存在-25~-15℃。

组分	数量	体积	管盖颜色
Fragmentation Buffer	1	135 μL	橙色
Fragmentation Enzyme Mix	1	40 μL	橙色
1 × TE	1	800 μL	橙色
Ligation Mix	1	576 μL	蓝色
Ligation booster	1	20 μL	蓝色
Adaptor	1	50 μL	蓝色
Library Amp Mix v2	1	480 μL	白色

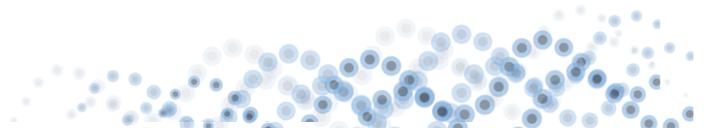
**Box 5: Library Adapters V2**

收到试剂盒后，请及时保存在-25~-15℃。

组分	数量	体积	管盖颜色
Indexing Primer Mix1 (ATCACGTT)	1	30 μL	白色
Indexing Primer Mix2 (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

**注意:**

- 按照各自的保存温度存放试剂。
- Barcoding Beads 禁止保存在低于 0℃的环境，避免结冰。



## 2. 自备仪器耗材试剂

### 通用试剂耗材:

- 无水乙醇
- 无核酸酶水
- 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
- 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
- DynaMag™-2 磁力架/12321D/Thermo 或其他兼容 1.5mL 离心管的磁力架

### 单细胞悬液制备和芯片加载 (Pre-PCR)

- RNase Away 或其他同类产品
- 不同规格无菌&无核酸酶吸头
- 兼容 15 mL 和 50 mL 锥形离心管的高速冷冻离心机
- 倒置显微镜
- 血球计数板
- 1×PBS (不含 Ca<sup>2+</sup> Mg<sup>2+</sup>)
- 0.4%台盼蓝染液
- 10 % Tween-20

### cDNA 扩增和文库构建 (Post-PCR)

- 恒温振荡金属浴
- PCR 仪
- 全自动核酸片段分析仪, 如 Agilent Fragment Analyzer 5200

- Qubit 4.0 荧光定量仪
- 0.6mL PCR 透明薄壁管 ( Qubit 定量, 推荐 Axygen )
- Ampure XP 纯化磁珠 ( Beckman )
- 10mM Tris-HCl pH 8.5 或 Elution Buffer
- 0.2mL 无菌&无核酸酶八联排管或 PCR 管

**注意:** 试剂耗材必须是无菌、无核酸酶的。

### 3. 工作流程和操作时间

Workflow	Station	Step duration	Stop point
Single cell partitioning	Pre-PCR station	1h	
mRNA capture			
Reverse transcription		1.5 - 2h	
cDNA amplification	Post-PCR station	1.5 - 2h	4°C overnight
Library preparation		3h	4°C for 48h or -20°C for a week
		<b>Total: 7 - 8h</b>	-20°C or -80°C for 3 months

图 1: 工作流程和操作时间

## 4. 实验准备

我们建议用户为所有需要无尘室条件的 PCR 前步骤建立一个“pre-PCR 区”。这些步骤包括组织解离、单细胞分离和 mRNA 捕获、反转录。对于 RNA 相关的工作，用 RNase Away(或同类产品)清洁所有工作台面和移液器。佩戴适当的口罩和实验室手套，以避免污染和 RNA 降解。

设立第二个实验区(Post-PCR)，进行 cDNA 扩增、纯化和 QC，以及文库制备和文库 QC。

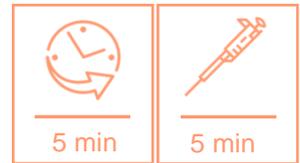
### 4.1 微流控芯片准备

#### 准备材料:

- 微流控芯片 (SCOPE-chip SD 或 HD)

#### 自备材料:

- PBS
- 10% Tween-20
- 无水乙醇
- 不同量程单通道移液器



1. 按下表制备 PBST(包含 0.02% v/v Tween-20 的 PBS)，随后涡旋混匀并瞬时离心。

#### PBST:

组分	1 RXN ( $\mu\text{L}$ )	2 RXNs ( $\mu\text{L}$ )
PBS	998	1996
10% Tween-20	2	4
Total	1000	2000

2. 将微流控芯片置于干净的培养皿上，用 200 $\mu\text{L}$  的移液器吸取 200 $\mu\text{L}$  无水乙醇从进样口注入芯片，时间控制在 10s，可使用移液器在芯片中来回抽吸无水乙醇直至芯片中不再出现气泡，及时移除出样口处液体。



图 2. 微流控芯片液体注入和移除示意图

3. 在不与出口端小孔接触的情况下，将乙醇从出样口中取出(注意避免将空气带入到芯片内)。
4. 重复步骤 2 和 3 的冲洗过程，共 3 次。
5. 移除出样口处液体后，吸取 200 $\mu$ L 0.02% PBST ( PBS 中包含 0.02% Tween-20 ) 从进样口处注入芯片，时间控制在 10s 以内，及时移除出样口处液体 ( 不用反复抽吸 ) ，重复此步骤冲洗过程 2 次后，及时移除出样口液体，并在出样口留下 50-100  $\mu$ L PBST 防止芯片干燥。
6. 盖上培养皿盖子，防止微流控芯片被污染，室温放置备用。

## 4.2 Barcode Beads 准备

### 准备材料:

- Barcode Beads SD 或 HD (黑色)

### 自备材料:

- DynaMag™-2 磁力架/12321D/Thermo 或其他兼容 1.5mL 离心管的磁力架
- PBS

1. 将 Barcode Beads 用移液器 ( 1mL 量程 ) 轻柔吹打 15 次混匀后，吸取 900 $\mu$ L Barcode Beads ( 1RXN ) 于 1.5 mL 离心管中，短暂离心后置于 1.5mL 规格磁力架 ( DynaMag™-2 磁力架 /12321D/Thermo, 本小节磁力架同规格 ) 上，静置 1min，待溶液澄清后，小心移除上清。



2. 清洗时需将离心管从磁力架上取下，加入 1mL PBS，瞬离后置于磁力架上，静置 1min，待溶液澄清后，小心移除上清，清洗 3 次即可。
3. 取下离心管，用 PBS 重悬定容至 80 $\mu$ L。若 1h 内使用，可放置在常温待用；若超过一小时不用，置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱待用。

## 5. 单细胞分离和 mRNA 捕获

### 5.1 Lysis Mix 准备

#### 准备材料:

- Lysis Buffer, Stock (绿色)
- 100mM DTT (绿色)
- RNase Inhibitor (绿色)



1. 室温解冻“Lysis Buffer, Stock”和“100mM DTT”，涡旋离心然后置于冰上。在冰上按下表格配制 Lysis Mix，涡旋混匀并短暂离心，置于冰上备用。

#### Lysis Mix (SCOPE–chip SD):

组分	1 RXN ( $\mu\text{L}$ ) × 1	2 RXNs ( $\mu\text{L}$ ) × 2.2
Lysis Buffer, Stock	92.5	203.5
100mM DTT	5	11
RNase Inhibitor	2.5	5.5
Total	100	220

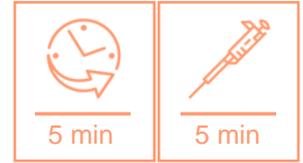
#### Lysis Mix (SCOPE–chip HD):

组分	1 RXN ( $\mu\text{L}$ ) × 1	2 RXNs ( $\mu\text{L}$ ) × 2.2
Lysis Buffer, Stock	138.7	305
100mM DTT	7.5	16.5
RNase Inhibitor	3.8	8.5
Total	150	330

## 5.2 细胞悬液准备

### 自备材料:

- PBS
- 单细胞悬液



1. 用 PBS 将细胞悬液稀释至  $1.5 \times 10^5 - 3.5 \times 10^5$  cells/mL (SD 芯片) 或  $1.5 \times 10^5 - 5.0 \times 10^5$  cells/mL (HD 芯片), 即可用于芯片实验。

**注意:** 只有一小部分加载在芯片上的细胞会被捕获到微孔中。例如, 要在 SCOPE-chip SD 上捕获 10,000 个细胞(第一个表, 左列), 需要 100  $\mu$ L 的  $3.5 \times 10^5$  细胞/mL 悬液(右列)(35000 个细胞)来加载 SCOPE-chip

### SCOPE-chip SD:

目标细胞捕获数	推荐的细胞悬液浓度
3000-5000	$(1.5-2.0) \times 10^5$ cells /mL
5000-7000	$(2.0-2.5) \times 10^5$ cells /mL
7000-9000	$(2.5-3.0) \times 10^5$ cells /mL
9000-10000	$(3.0-3.5) \times 10^5$ cells /mL

### SCOPE-chip HD:

目标细胞捕获数	推荐的细胞悬液浓度
9000-12000	$(1.5-2.0) \times 10^5$ cells /mL
12000-15000	$(2.0-2.5) \times 10^5$ cells /mL
15000-18000	$(2.5-3.0) \times 10^5$ cells /mL
18000-24000	$(3.0-4.0) \times 10^5$ cells /mL
24000-30000	$(4.0-5.0) \times 10^5$ cells /mL

### 5.3 单细胞分离

(视频演示的链接见附录 B)



#### 准备材料:

- 预处理好的 SCOPE-chip SD 或 HD (见 4.1 微流控芯片准备)
- 稀释好的细胞悬液 (见 5.2 细胞悬液准备)

#### 自备材料:

- PBS
  - 200  $\mu$ L 移液器吸头
1. 移除进出样口多余液体, 加 200 $\mu$ L PBS 润洗芯片 (注入时间控制在 10s 以内, 避免气泡进入), 然后移除出样口及进样口多余液体, 重复润洗 1 次。
  2. 吸取 100 $\mu$ L (SD)/150 $\mu$ L (HD)重悬好的细胞, 缓慢匀速 (约 30s) 注入芯片, 立即移除出样口多余液体, 以避免气泡引入。

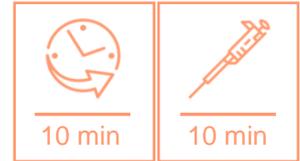
#### 注意:

- 细胞注入芯片时, 可以在进样口保留一些液体, 避免气泡进入。
- 移液器向芯片注入细胞时, 吸头应当保持与芯片垂直。

3. 静置 5min 使细胞落入微孔内, 静置期间可在显微镜下观察细胞落入微孔情况。
4. 待细胞落入微孔内, 吸取 200 $\mu$ L PBS 缓慢匀速 (约 30s) 注入芯片冲洗掉多余细胞, 立即移除出样口液体。
5. 重复 1 次步骤 4, 冲洗掉留在表面未落入微孔内的细胞。
6. 在显微镜下观察芯片通道内表面黏附的多余细胞是否去除干净, 若还有残留, 可继续加 PBS 冲洗 (冲洗时应缓慢匀速, 避免气泡引入)。
7. (选做) 在显微镜下拍照计数各视野的细胞数, 记录数据。

## 5.4 注入 Barcode Beads

(视频演示的链接见附录 C)



### 准备材料:

- 上一个步骤中包含细胞的 SCOPE-chip SD 或 HD 芯片
- 预处理后的 Barcode Beads (见 4.2 Barcode Beads 准备)

### 自备材料:

- PBS
  - 200  $\mu$ L 移液器吸头
1. 吸取 80  $\mu$ L 重悬好的 Barcode Beads, 缓慢匀速 (约 30s) 加入进样口, 将 Barcode Beads 注入芯片, 静置 1 min。
  2. 多次吸取 100 $\mu$ L PBS, 缓慢匀速 (约 30s) 加入进样口, 使 Barcode Beads 缓慢流动, 及时吸取出样口 Barcode Beads, 直至达到芯片的另一端, 在此期间收集出样口的多余 Barcode Beads。
  3. 吸取 200 $\mu$ L PBS 缓慢匀速注入芯片 (约 30s)。
  4. 从出样口收集多余 Barcode Beads 置于新 1.5 mL 离心管中 (收集时不与出样口端接触)。
  5. 重复 2 次步骤 3, 以去除多余 Barcode Beads。
  6. 在显微镜下观察多余 Barcode Beads 是否去除干净, 若还有残留, 继续加 PBS 冲洗。

**注意:** 显微镜下观察 Barcode Beads 掉入孔中的情况, Barcode Beads 应至少占据微孔总数 95%。若芯片进样口端 Barcode Beads 空缺较多, 可将回收的 Barcode Beads 置于磁力架上, 吸除大部分上清液提高 Beads 密度后再次注入到 Beads 空缺处, 静置 10 s 后再冲洗; 同理, 若芯片出样口端 Barcode Beads 空缺较多, 可将回收的 Barcode Beads 注入到出口槽处, 用移液器从进样口端将 Beads 吸入空缺处, 静置 10 s 后再冲洗。

## 5.5 细胞裂解和 mRNA 捕获



### 准备材料:

- 上一个步骤中包含细胞和磁珠的 SCOPE-chip SD 或 HD 芯片
- 配好的 Lysis Mix (见 5.1 Lysis Mix 准备)

### 自备材料:

- 200  $\mu$ L 移液器吸头

**注意:** 为防止 RNA 降解, 实验开始前用 RNase away 喷洒实验台, 5min 后擦干。

1. 吸取 100 $\mu$ L (SD) 或 150  $\mu$ L (HD) Lysis Mix, 从进样口缓慢注入芯片, 时间约 30 s, 立即移除进出样口多余液体。
2. 室温静置 20 min 用于裂解细胞并释放 mRNA, 让 Barcode Beads 捕获 mRNA。

## 5.6 取出 Barcode Beads

(详细的图片工作流程和视频手册链接见附录 D)



### 准备材料:

- 步骤 5.5 的芯片
- Singleron Magnetic Rack
- Wash Buffer A

### 自备材料:

- 200  $\mu$ L 移液器吸头

1. 提前准备 1.5 mL 离心管和 Wash Buffer A, 标记后置于冰上备用。
2. 用 200 $\mu$ L Wash Buffer A 加入出样口, 将磁力架转移置于芯片顶部, 静置 1min, 保持磁力架在芯片顶部, 将 200 $\mu$ L 移液器吸头插入进样口, 吸取 200 $\mu$ L 液体, 收集到的含有 Barcode Beads 的液体转移至预冷的 1.5mL 离心管内, 每次转移液体后都应及时合上 1.5mL 离心管管盖。

3. 重复 2 次步骤 3，收集捕获到 mRNA 的全部 Barcode Beads。



图 3. Barcode Beads 取出示意图

**注意：**在显微镜下观察，若孔内剩余 Barcode Beads 很多，可重复操作步骤，直至 90%以上的 Barcode Beads 被取出。若取 Barcode Beads 过程 Barcode Beads 出现结团，可使用移液器将 Barcode Beads 轻柔吹散即可。



## 6. 反转录 cDNA 扩增

### 6.1 反转录



#### 准备材料:

- Wash Buffer B
- RT Master Mix (紫色)
- TS Primer (紫色)
- RNase Inhibitor (绿色)
- Reverse Transcriptase (紫色)
- 上一步骤捕获了 mRNA 的 Barcode Beads
- Wash Buffer A

#### 自备材料:

- 无核酸酶水
  - DynaMag™-2 磁力架/12321D/Thermo 或其他兼容 1.5mL 离心管的磁力架
1. 体系配制: 提前室温解冻“RT Master Mix”和“TS primer”, 涡旋 10s 后短暂离心然后置于冰上, 在冰上按照如下表格配制 RT Mix, 涡旋 10s 混匀并短暂离心(若 RT Master Mix 试剂溶液中有沉淀物, 请用手指轻弹试剂管壁)。

#### RT Mix (SCOPE-chip SD):

Component	1 RXN ( $\mu\text{L}$ ) × 1	2 RXNs ( $\mu\text{L}$ ) × 2.2
RT Master Mix	120	264
Cold nuclease-free water	45	99
TS Primer	10	22
RNase Inhibitor	5	11
Reverse Transcriptase	20	44
Total	200	440

## RT Mix (SCOPE–chip HD):

Component	1 RXN ( $\mu\text{L}$ ) × 1	2 RXNs ( $\mu\text{L}$ ) × 2.2
RT Master Mix	240	528
Cold nuclease–free water	90	198
TS Primer	20	44
RNase Inhibitor	10	22
Reverse Transcriptase	40	88
Total	400	880

2. 将收集 Barcode Beads 的离心管短暂离心后置于 1.5mL 规格磁力架 (DynaMag™–2 磁力架 /12321D/Thermo, 本小节磁力架同规格) 上, 待溶液澄清后, 小心吸除上清液。从磁力架上取下离心管, 用 1mL 移液器加入 1mL Wash Buffer A, 吹打 5 次混匀后短暂离心, 置于磁力架上, 待溶液澄清后小心移除上清。
3. 从磁力架上取下离心管, 加入 500 $\mu\text{L}$  Wash Buffer B, 吹打 5 次混匀后短暂离心, 置于磁力架上, 待溶液澄清后小心移除上清。
4. 取下离心管, 短暂离心后再置于磁力架上, 用 20 $\mu\text{L}$  的移液器吸取残余的液体。只留下离心管底部的 Barcode Beads。
5. 迅速取下离心管, 加入 200 $\mu\text{L}$  (SD 芯片) / 400 $\mu\text{L}$  (HD 芯片) 配好的 RT Mix, 并吹打混匀。
6. 置于提前设置好的金属浴中, 42 $^{\circ}\text{C}$ , 转速 1300 rpm, 反应 90min (提前预热)。

**注意:** 42 $^{\circ}\text{C}$ 反应 90min 后, 若无法立即进行下一步, 将反转录产物 70 $^{\circ}\text{C}$  (关闭振荡) 灭活 15min 后, 可室温放置 15h (可在金属浴上过夜)。

## 6.2 cDNA 扩增

### 准备材料:

- Amplification Master Mix (透明)
- A Primer Mix (透明)
- Amplification Enzyme (透明)



- 上一步的反转录产物

**自备材料:**

- 0.2mL 无菌&无核酸酶八联排管
- 无核酸酶水
- DynaMag™-2 磁力架/12321D/Thermo 或其他兼容 1.5mL 离心管的磁力架

1. 根据下表，在 PCR 仪上设置 cDNA 扩增程序。PCR 仪的热盖设置为 105°C。

Lid Temperature 105°C		Reaction Volume 50µL	
步骤	温度	时间	
1	95°C	3 min	
	98°C	20 sec	
2	65°C	45 sec	
cycles = 4	72°C	3 min	
	98°C	20 sec	
3	67°C	20 sec	
cycles = 9	72°C	3 min	
4	72°C	5 min	
5	4°C	Hold	

2. 提前室温解冻 “Amplification Master Mix”、“A Primer Mix”，涡旋离心然后置于冰上，按照如下表格在冰上配制 PCR Mix，涡旋混匀并短暂离心。冰上放置。

**PCR Mix (SCOPE–chip SD):**

组分	1 RXN ( µL ) ×1	2 RXNs ( µL ) ×2.2
Amplification Master Mix	172	378.4
A Primer Mix	32	70.4
Cold nuclease–free water	188	413.6
Amplification Enzyme	8	17.6
<b>Total</b>	<b>400</b>	<b>880</b>

**PCR Mix (SCOPE-chip HD):**

组分	1 RXN ( $\mu\text{L}$ ) ×1	2 RXNs ( $\mu\text{L}$ ) ×2.2
Amplification Master Mix	344	756.8
A Primer Mix	64	140.8
Cold nuclease-free water	376	827.2
Amplification Enzyme	16	35.2
<b>Total</b>	<b>800</b>	<b>1760</b>

- 将反转录产物短暂离心，置于 1.5mL 规格磁力架上，待溶液澄清后小心移除上清，仅留下 Barcode Beads。
- 将离心管从磁力架上取下，向管中加入 400  $\mu\text{L}$  ( SD 芯片 ) / 800  $\mu\text{L}$  ( HD 芯片 ) PCR Mix，一边吹打混匀，一边分装到八联排管中，每管分装液体体积为 50 $\mu\text{L}$  ( HD 芯片可使用 2 条 8 联排管 )。

**注意：** 后续的步骤应当在“Post-PCR”区进行，避免实验环境污染。

- 盖好八联排管管盖，置于 PCR 仪中进行扩增，设置热盖温度 105 $^{\circ}\text{C}$ ，反应体积 50 $\mu\text{L}$ 。
- PCR 程序运行结束后，可将扩增产物在 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存 48h 和 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存一周，或者直接进行 cDNA 扩增纯化。

**6.3 cDNA 产物纯化****准备材料：**

- 上一步扩增后的 cDNA

**自备材料：**

- 1.5mL 离心管
- 无水乙醇
- 无核酸酶水
- 10mM Tris-HCl pH 8.5 或 Elution Buffer
- AMPure XP 纯化磁珠
- DynaMagTM-2 磁力架/12321D/Thermo 或其他兼容 1.5mL 离心管的磁力架

**注意：**

- AMPure XP 纯化磁珠需提前 30min 取出，恢复至室温后，方可使用。使用前需充分涡旋混匀。
- AMPure XP 纯化磁珠比较粘稠，应缓慢吸取和加入，确保吸取和加入的体积精准。否则将导致分选的片段长度与预期不一致。

1. 每反应准备 2 mL (SD 芯片) / 4 mL (HD 芯片) 80%乙醇。将 PCR 扩增产物收集到 1.5mL 离心管中 (HD 芯片收集到 2 个 1.5mL 离心管中)，短暂离心，用移液器测量体积，加入 Ampure XP 纯化磁珠体积为 PCR 扩增产物总体积的 0.6x。例如：PCR 扩增产物总体积为 400  $\mu$ L，则加入  $0.6 \times 400 = 240 \mu$ L 纯化磁珠 (HD 芯片需加入 480  $\mu$ L)。
2. 涡旋 15s 混匀后，室温孵育 5min，短暂离心，置于 1.5mL 规格磁力架上静置 5min；至液体透明澄清，小心吸除上清液至新的 1.5mL (或 2mL) 离心管中，暂留。

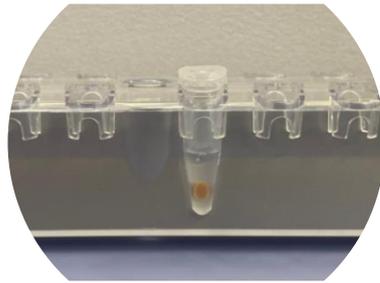


图 4. AMPure Beads 在磁力架上吸附示意图

3. 保持离心管始终处于磁力架上，加入 800 $\mu$ L 新配制的 80% 乙醇漂洗磁珠。室温孵育 30s，小心移除上清。
4. 重复步骤 3，共计漂洗 2 次。
5. 取下离心管，短暂离心，再次置于磁力架上，吸去多余酒精，开盖晾干约 2min(不要超过 5min)。
6. 取下离心管，加入 20 $\mu$ L Elution Buffer，充分涡旋混匀，室温孵育 5min，短暂离心后静置于磁力架上，至液体透明澄清。
7. 吸取上清并转移至新的 1.5mL 离心管中，即为纯化产物。(对于 HD 芯片，可将两个 1.5mL 离心管中上清液合并至一个管中)
8. 样品于 4 $^{\circ}$ C 可保存 72h，在 -20 $^{\circ}$ C 可保存一周，或者可直接进行 cDNA 扩增纯化后的 QC 和定量。

## 6.4 cDNA QC

### 准备材料:

- 上一步纯化好的 cDNA



### 自备材料:

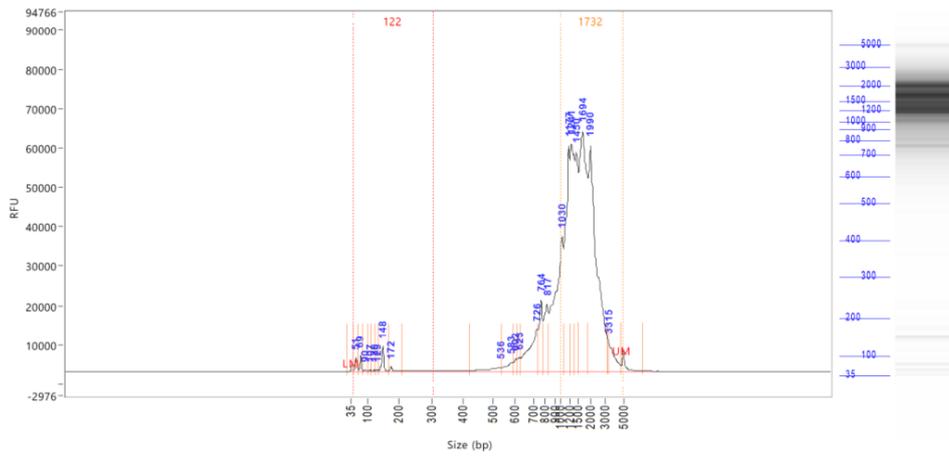
- Qubit 4.0 荧光定量仪
- 0.6mL PCR 透明薄壁管 (Qubit 定量, 推荐 Axygen)
- 全自动核酸片段分析仪, 如 Agilent Fragment Analyzer 5200

1. 取 1  $\mu$ L 纯化后的 cDNA 产物, 用 Qubit 4.0 荧光定量仪进行浓度定量。
2. 取约 5ng cDNA, 用 Agilent Fragment Analyzer 5200 进行片段分布分析。合格的 cDNA 应同时满足以下几个条件: 主峰片段大小应在 900–2000bp 左右; 1000bp–5000bp 占比大于 15%; 300bp 以下片段占比小于 40%。cDNA 评级分布见下表。(若在满足“合格”类条件下同时存在基线上调或拖尾严重情况, 评级评定为“风险”)

质控等级	评判标准	对应处理
合格	Qubit 检测总量 > 30ng, 质检主峰 900bp–2000bp 之间, 1000bp–5000bp 占比 > 15%, 300bp 以下片段占比 < 10%	建议直接进行建库
风险	不满足“合格/不合格”任一评级条件	尝试风险建库
不合格	Qubit 检测总量 < 30 ng, 质检主峰 < 500bp 或主峰不明显	不建议进行建库实验

3. 若质检发现 cDNA 300bp 以下片段占比在 10–40% 时, 将剩余 cDNA 的体积用无核酸酶水补充到 100 $\mu$ L, 然后按下表的磁珠比例进行二次纯化。二次纯化后满足步骤 2 的“合格”要求仍可直接建库。

40–300 bp 片段占比	纯化磁珠比例
10% – 20%	0.8 x
21% – 35%	0.7 x
> 35%	0.6 x



## 7. 转录组文库构建

### 7.1 片段化

#### 准备材料:

- Fragmentation Buffer ( 橙色 );
- Fragmentation Enzyme Mix ( 橙色 );
- 1×TE ( 橙色 );
- 步骤 6.4 的 QC 合格的 cDNA 产物



#### 自备材料:

- 无核酸酶 PCR 管

1. 提前按照下表设置片段化 PCR 程序，反应体积 35 $\mu$ L，并使 PCR 仪热盖保持在 75 $^{\circ}$ C。

热盖温度: 75 $^{\circ}$ C		反应体积: 35 $\mu$ L
Step	Temperature	Time
1	37 $^{\circ}$ C	5 min
2	65 $^{\circ}$ C	30 min
3	4 $^{\circ}$ C	Hold

2. 室温解冻 Fragmentation Buffer，确保完全融化，涡旋混匀（5–8 秒）并短暂离心后冰上备用；如果看到沉淀，涡旋混匀至沉淀消失，溶液变澄清。
3. 使用前将 Fragmentation Enzyme Mix 涡旋振荡（5–8 秒）并瞬离，置于冰上备用。
4. 按照以下建议的 cDNA 模板投入量进行建库：
  - ① cDNA 总量在 10–50ng 时，选择 10ng 投入量进行建库。
  - ② cDNA 总量在 50ng 以上时，选择 50ng 投入量进行建库。
5. 将 PCR 管置于冰上，配制如下反应体系：

片段化反应体系:

组分	体积 (μL)
Diluted cDNA (10ng 或 50ng)	Variable
1× TE	Variable
Fragmentation Buffer	7
Fragmentation Enzyme Mix	2
<b>Total</b>	<b>35</b>

- 用移液器轻柔吹打充分混匀，瞬时离心后将 PCR 管置于预热的 PCR 仪中并运行片段化程序。
- 完成反应后立即进行下一步接头连接。

## 7.2 接头连接



准备材料:

- Ligation Mix (蓝色);
  - Ligation Booster (蓝色);
  - Adaptor (蓝色);
  - 步骤 7.1 的片段化产物
- 提前按照下表设置接头连接 PCR 程序，反应体系 70μL，并关闭 PCR 仪热盖加热功能，若 PCR 仪无此功能，将热盖设置到最低温度。

热盖温度: OFF		反应体积: 70μL
Step	Temperature	Time
1	20°C	15 min
2	4°C	Hold

- 室温解冻 Adaptor，涡旋混匀后冰上备用。使用前将 Ligation Mix 涡旋混匀，短暂离心后置于冰上备用。
- Ligation Mix 较粘稠，吸取时注意量取准确体积（多反应体系时建议 Adaptor 单独加入）。
- 将上一步反应的 PCR 管置于冰上，配制如下反应体系:

接头连接反应体系\*：

组分	体积 ( $\mu\text{L}$ )
Fragmented cDNA	35
Ligation Mix**	30
Ligation booster	1
Adaptor	2.5
Total	68.5

\*多反应体系时不建议配制成一个 *master mix*。

\*\*Ligation Mix 比较粘稠，小心移液确保体积准确。

5. 涡旋混匀并分离。将反应管置于 PCR 仪中立即运行接头连接程序。

### 7.3 接头连接后产物纯化

准备材料：



- 0.1×TE (使用 Nuclease-free Water 按 1:9 稀释 1×TE) (橙色)；
- 步骤 7.2 的接头连接产物

自备材料：

- 无核酸酶水；
- Ampure XP 纯化磁珠；
- 无水乙醇；
- PCR 仪；
- 不同量程单通道移液器；
- 无核酸酶 PCR 管；
- 磁力架/TND08-C-A/深圳拓能达 或 DynaMag<sup>TM</sup>-PCR 磁力架/492025/Invitrogen

注意：

- Ampure XP 纯化磁珠 (以下简称磁珠) 提前 30min 从 4°C 中取出，恢复室温备用。
- 磁珠使用前需充分涡旋 15s 振荡混匀。
- 磁珠比较粘稠，应确保精确量取，缓慢加入，否则可能导致分选的片段长度与预期不一致。

- 离心管放置到磁力架上后不应再旋转，因此摆放时需确定离心管开盖方向，离心时，离心管开盖方向朝内放置。

1. 每个反应准备 0.5mL 80%乙醇和 25 $\mu$ L 0.1 X TE 溶液（将 1 X TE 与无核酸酶水以 1:10 稀释）。
2. 将产物 PCR 管短暂离心，用移液器测量体积，涡旋混匀磁珠，Ampure XP 纯化磁珠体积为 0.2x 产物总体积。（例如：片段化产物体积为 68.5  $\mu$ L，则应使用 0.2 x 68.5=13.7  $\mu$ L Ampure XP 纯化磁珠，室温孵育 5min。）

注：磁珠比较粘稠，需充分涡旋振荡混匀后准确移取相应的体积，否则可能导致分选的片段长度与预期不一致。

3. 将 PCR 管短暂离心后置于 0.2mL 规格磁力架（磁力架/TND08-C-A/深圳拓能达，本小节磁力架同规格）上，使纯化磁珠与液体分离，待溶液澄清后（约 5min），小心移除上清至一个新的无核酸酶 PCR 管中，暂时留存。
4. 保持 PCR 管置于磁力架上，用 200 $\mu$ L 新鲜配制的 80%乙醇漂洗磁珠，室温孵育 30s，小心移除上清。
5. 重复步骤 4，总计漂洗 2 次。
6. 从磁力架上取下纯化磁珠所在 PCR 管，短暂离心，再次置于磁力架上，吸去多余酒精，开盖晾干磁珠 2min（不要超过 5min）。
7. 将纯化磁珠所在 PCR 管从磁力架上取下，加入 17 $\mu$ L 0.1 $\times$  TE，涡旋振荡 15s 混匀磁珠，室温孵育 5min。
8. 将纯化磁珠所在 PCR 管短暂离心后置于磁力架上，使磁珠与液体分离，待溶液澄清后（约 5min），小心吸取 15 $\mu$ L 上清至新的灭菌 PCR 管中用于步骤 7.4 PCR 富集。

**注意：**此步骤结束后可以将样品于 4 $^{\circ}$ C 保存 72 小时，-20 $^{\circ}$ C 保存一周。

## 7.4 PCR 富集

### 准备材料:

- Library Amp Mix V2 (白色);
- Indexing Primer Mix (白色);
- 步骤 7.3 的接头连接后纯化产物。



1. 提前按照下表设置 PCR 富集程序, 并使 PCR 仪热盖保持在 105°C, 反应体积 50 $\mu$ L。

热盖温度: 105°C		反应体积: 50 $\mu$ L	
Step	Temperature	Time	
1	98°C	30 sec	
2 (循环数参见下表)	98°C	10 sec	
	65°C	75 sec	
3	65°C	5 min	
4	4°C	Hold	

2. 将 PCR 管置于冰上, 配制如下反应体系, 涡旋混匀并短暂离心, 将反应管置于 PCR 仪中。

组分	体积 ( $\mu$ L)
接头连接纯化后产物 (步骤 7.3 产物)	15
Library Amp Mix V2	25
Indexing Primer Mix	10
Total	50

扩增循环数需按 cDNA 投入量进行选择, 选择要求如下:

cDNA 投入量	参考循环数
50ng	10
10ng	12

## 7.5 扩增产物片段分选

### 准备材料:

- 步骤 7.4 的 PCR 富集产物



### 自备材料:

- 10mM Tris-HCl pH 8.5 或 Elution Buffer;
- Ampure XP 纯化磁珠;
- 新鲜配制的 80%乙醇;
- 不同量程单通道移液器;
- 无核酸酶 PCR 管;
- 1.5mL 离心管;
- 磁力架/TND08-C-A/深圳拓能达或 DynaMag™-PCR 磁力架/492025/Invitrogen。

**注意:**

- Ampure XP 纯化磁珠（以下简称磁珠）提前 30min 从 4℃ 中取出，恢复室温备用。
- 磁珠使用前需充分涡旋 15s 振荡混匀。
- 磁珠比较粘稠，应确保精确量取，缓慢加入，否则可能导致分选的片段长度与预期不一致。
- 离心管放置到磁力架上后不应再旋转，因此摆放时需确定离心管开盖方向，离心时，离心管开盖方向朝内放置。

1. 每个反应准备 0.5mL 80%乙醇。
2. 将 7.4 产物 PCR 管短暂离心，用移液器测量体积，并用 NF 水补齐至 50 $\mu$ L。涡旋混匀磁珠，取 25 $\mu$ L 磁珠加入到 PCR 产物中，盖上 PCR 管盖，涡旋混匀并瞬时离心，室温孵育 5min。  
  
注：纯化磁珠比较粘稠，需充分涡旋振荡混匀后准确移取相应的体积，否则可能导致分选的片段长度与预期不一致。
3. 将 PCR 管短暂离心后置置于 0.2mL 规格磁力架（磁力架/TND08-C-A/深圳拓能达，本小节磁力架同规格）上静置，使纯化磁珠与液体分离，待溶液澄清后（约 5min），小心回收上清液至一个新的无菌 PCR 管中，丢弃纯化磁珠。
4. 涡旋振荡混匀磁珠并吸取 7.5 $\mu$ L 加入至上清中，涡旋振荡充分混匀，室温孵育 5min。
5. 将 PCR 管短暂离心后置置于磁力架上，使纯化磁珠与液体分离，待溶液澄清后（约 5min），小心转移上清液置于新的 PCR 管暂时留存。
6. 保持 PCR 管始终处于磁力架上，加入 200 $\mu$ L 新鲜配制的 80% 乙醇漂洗磁珠。室温孵育 30s，小心移除上清。

7. 重复步骤 6，总计漂洗 2 次。
8. 从磁力架上取下 PCR 管，短暂离心，再次置于磁力架上，吸去多余酒精，开盖晾干磁珠 1min（不要超过 2min）。
9. 将 PCR 管从磁力架上取出，加入 20 $\mu$ L Buffer EB 洗脱。涡旋振荡 15s 混匀纯化磁珠，室温孵育 5min。
10. 将 PCR 管短暂离心并置于磁力架上，使纯化磁珠与液体分离，待溶液澄清后（约 5min）小心吸取 18 $\mu$ L 上清至新的灭菌 1.5mL 离心管中。

**重要提示:** 此步骤结束后可以将样品于-20 $^{\circ}$ C或-80 $^{\circ}$ C保存三个月。

## 7.6 文库质检

### 准备材料:

- 步骤 7.5 的纯化产物

### 自备材料:

- 全自动核酸片段分析仪及配套试剂
  - Qubit 1x dsDNA HS assay kit
  - Qubit 测定管
1. 取 1 $\mu$ L 纯化后的文库，用 Qubit 4 荧光计测定浓度。
  2. 取约 5ng 纯化后的文库，用 Agilent Fragment Analyzer 5200 或同等设备测定片段大小分布。（按片段分析仪的建议稀释样品）。
  3. 理想的文库应符合以下标准：
    - a. 主峰片段范围应在 400 bp 至 700 bp 之间。
    - b. 900 bp 至 1500 bp 之间的片段占比小于 10% 。
    - c. 300 bp 以下的片段占比小于 10% 。



4. 质控标准及处理方案如下:

质控等级	评判标准	对应处理
合格	Qubit 检测总量>100ng, 主峰 400bp-700bp 之间, 300bp 以下和 900bp 以上片段占比均<10%	建议直接上机测序
风险	Qubit 检测总量>50ng, 主峰 400b-700bp 之间, 300bp 以下或 900bp 以上片段占比 10%-20% (包含 10%和 20%)	可尝试风险上机测序
不合格	满足以下任意一条: Qubit 检测总量 <50ng, 主峰<400bp 或主峰不明显, 300bp 以下片段或 900bp 以上片段占比 >20%	不建议上机测序

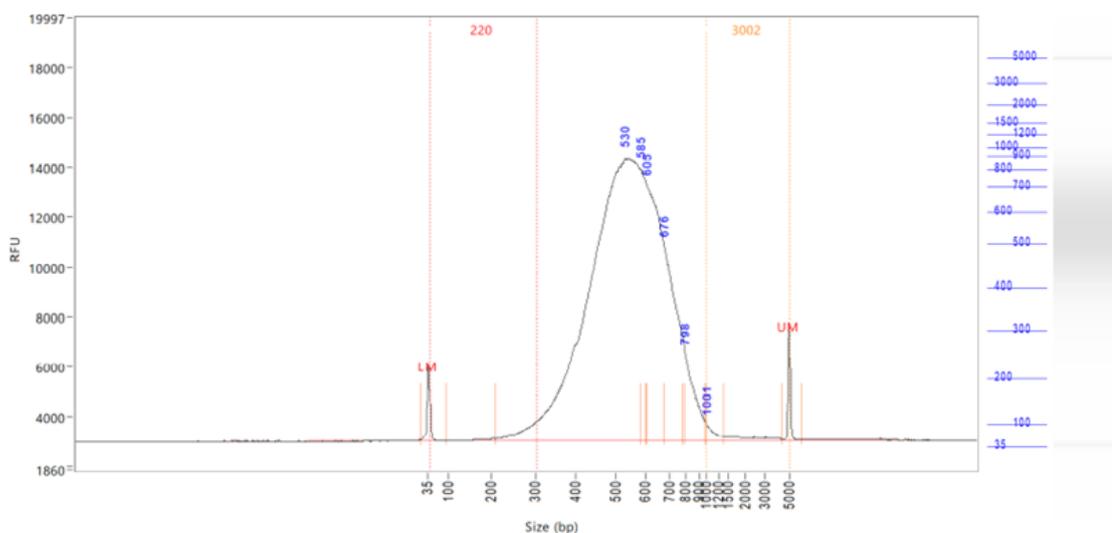


图6 文库质检图

## 附录 A 技术原理

### 单细胞分离和 mRNA 捕获、反转录及 PCR 富集原理

利用 SCOPE-chip®微流控芯片捕获单细胞，并将数百万个携带独特细胞标签（Cell Barcode）的 Barcode Beads 加入到芯片微孔中，确保每个微孔内只落入 1 个 Barcode Bead。

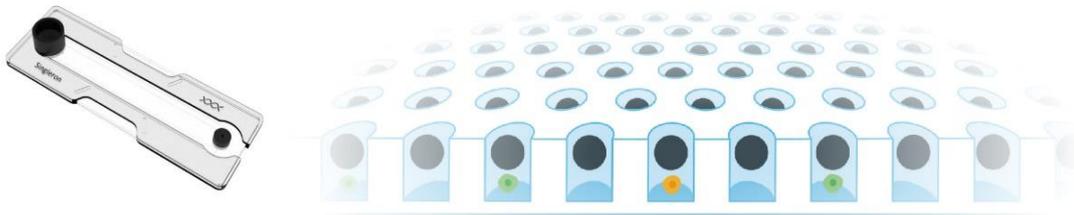


图 A1: SCOPE-chip®微流控芯片外形（左）及细微结构（右）

Barcode Beads 的 Oligo 序列包含 illumina Read 1 测序引物序列用于测序，细胞标签（Cell Barcode）用于区分单细胞，分子标签(UMI)用于定量 mRNA 和 PolyT 核苷酸序列用于捕获细胞释放的 mRNA。细胞裂解后，Barcode Beads 通过与 mRNA 上的 poly (A) 尾结合捕获 mRNA，对细胞及 mRNA 进行标记。收集芯片中的 Barcode Beads，将 Barcode Beads 捕获的 mRNA 反转录为 cDNA 并扩增。将 cDNA 经过片段化、连接接头等步骤后构建适用于 illumina 测序平台的测序文库。

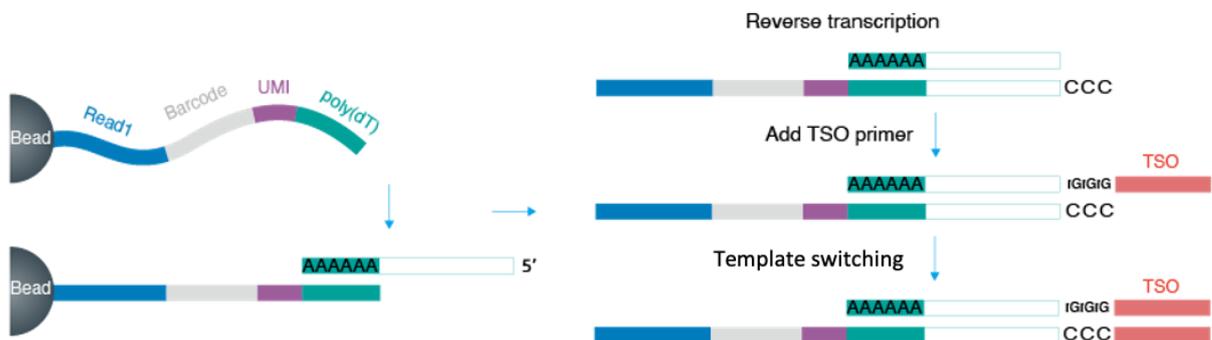


图 A2: 磁珠捕获 mRNA 及反转录原理图

### cDNA 富集扩增原理

通过磁珠 5' 端的 PCR handle 序列（适配 illumina 二代测序平台的测序引物）及反转录过程中添加上的 TSO 序列，扩增完成全长转录组的富集。

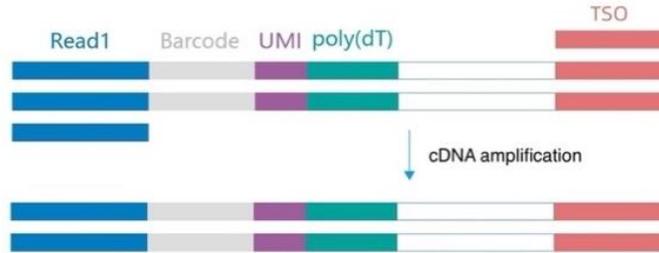


图 A3: cDNA 富集扩增原理图

### 转录组文库构建原理

为满足二代测序对测序文库长度的要求，逆转录扩增获取到的 cDNA 需要进行片段化（Fragment），首先利用化学方法将 cDNA 打断成约 500bp 左右的片段，cDNA 片段化、末端修复和加 A，并进行 cDNA 片段筛选，P7 Adapter 接头连接并通过 PCR 扩增引入样品 Index，最后进行片段筛选从而得到 cDNA 文库。

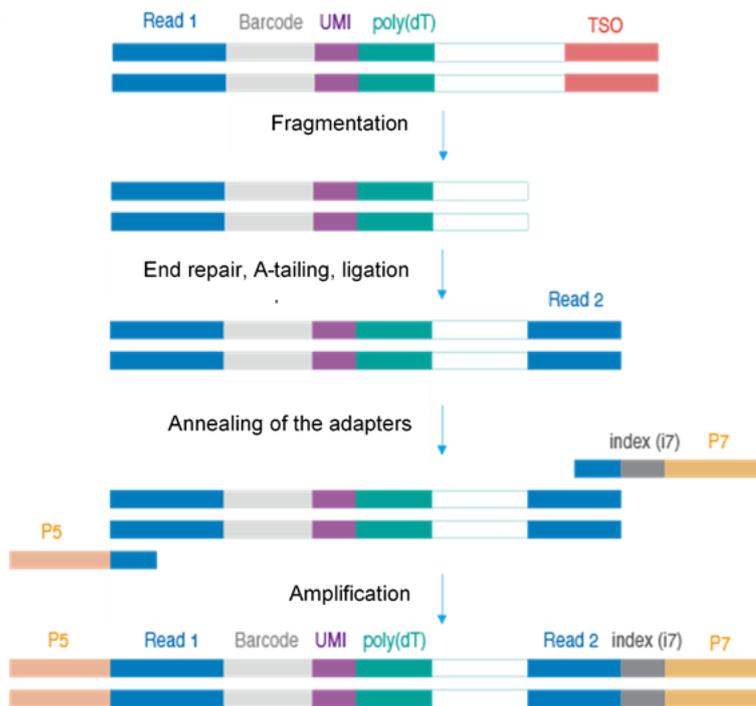


图 A4: 转录组文库构建原理图

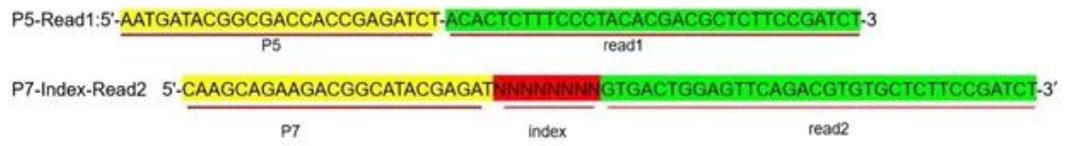


图 A5: 转录组 illumina 文库结构图 (左右两侧序列)



## 附录 B 单细胞加载和分离

用细胞加载 SCOPE–chip 的视频手册可以在这里访问：

<https://youtu.be/xrvxoe19iZk>



## 附录 C Barcode Beads 加载

Barcode Beads 加载到 SCOPE–chip 的视频手册可在此处访问：

<https://youtu.be/6Lg6aySKA3o>



## 附录 D: Barcode Beads 取出和回收

Barcode Beads 从 SCOPE–chip 中取出和回收的视频手册可在此处访问：

[https://youtu.be/UuNip\\_AJ2Qs](https://youtu.be/UuNip_AJ2Qs)



## 附录 E 测序

### 测序文库

GEXSCOPE®单细胞 RNA 文库试剂盒产生标准的 Illumina 单端测序文库，以 P5 开始，以 P7 结束。通过“Read1”测序引物定位 60 碱基条形码(27 个碱基的独特序列加上间隔序列)。文库包含了一个 8 碱基的 i7 index 序列(参见 1.2 产品组成)。P5 和 P7 是桥式扩增时使用的标准 Illumina 测序序列。

进行双端测序，其中 read1 用于解析 60 碱基条形码和 12 碱基 UMI，而 read2 用于获得基因特异性序列。标准 Illumina FASTQ 文件是通过对这些文库进行测序而产生的。



图 E: 测序文库结构

### 测序仪

Singleron Biotechnologies 验证了下面列出的测序仪的兼容性。测序仪的选择会影响检测性能。有关测序的更多信息，请访问 Singleron 生物技术支持网站。

- HiSeq X Series
- NovaSeq 6000
- NovaSeq X

### 测序深度和运行参数

#### 测序深度

- 外周血单核细胞(PBMC)或淋巴细胞每个细胞 30,000 reads。
- 其他细胞类型，每个细胞 50,000reads。

## 测序模式

测序	循环数
Read 1*	150
i7 Index	8
Read 2 <sup>#</sup>	150

\*对于 read1, 至少测 75bp, 以确保测到 barcode 和 UMI;

<sup>#</sup>对于 read2, 至少测 100bp 以上, 以确保参考基因组比对的准确性, 建议测 150bp。

Singleron Biotechnologies GmbH

Phone: +49 (0) 221 16824777

Email: [info@singleronbio.com](mailto:info@singleronbio.com)

Email: [tech-support@singleron.bio](mailto:tech-support@singleron.bio)

Website: [www.singleron.bio](http://www.singleron.bio)

Singleron Biotechnologies Inc

Phone: 1 734-249-0883/ 1 734-249-2714

Email: [info@singleronbio.com](mailto:info@singleronbio.com)

Email: [tech-support.usa@singleron.bio](mailto:tech-support.usa@singleron.bio)

Website: [www.singleron.bio](http://www.singleron.bio)