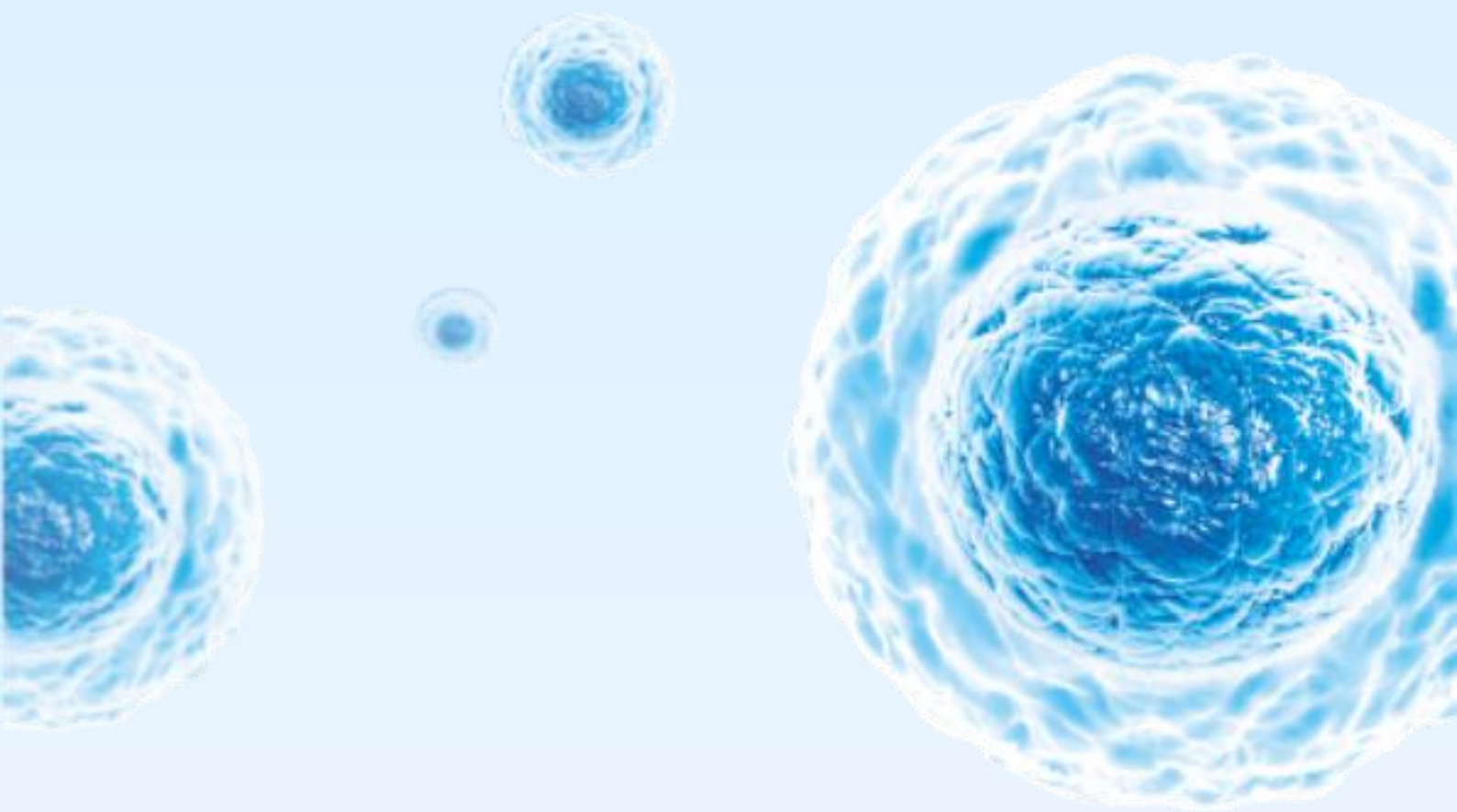




GEXSCOPE® Single Cell RNA Library Kit Cell

单细胞转录组建库试剂盒

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	2 RXNs
4180012	GEXSCOPE® Single Cell RNA Library Kit Cell	16 RXNs
4180031	GEXSCOPE® Single Cell RNA Library Kit Cell HD	2 RXNs
4180032	GEXSCOPE® Single Cell RNA Library Kit Cell HD	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
2025/04	4. 建库打断时间变更

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	- 2 -
2. 自备仪器耗材试剂	- 6 -
3. 工作流程和操作时间	- 8 -
4. 实验准备	- 9 -
4.1 微流控芯片准备	- 9 -
4.2 Barcode Beads 准备	- 10 -
5. 单细胞分离和 mRNA 捕获	- 12 -
5.1 Lysis Mix 准备	- 12 -
5.2 细胞悬液准备	- 12 -
5.3 单细胞分离	- 13 -
5.4 注入 Barcode Beads	- 14 -
5.5 细胞裂解和 mRNA 捕获	- 15 -
5.6 取出 Barcode Beads	- 15 -
6. 反转录 cDNA 扩增	- 17 -
6.1 反转录	- 17 -
6.2 cDNA 扩增	- 18 -
6.3 cDNA 产物纯化	- 20 -
6.4 cDNA QC	- 21 -
7. 转录组文库构建	- 23 -
7.1 片段化	- 23 -
7.2 接头连接	- 24 -
7.3 接头连接后产物纯化	- 25 -
7.4 PCR 富集	- 26 -
7.5 扩增产物片段分选	- 27 -
7.6 文库质检	- 28 -

附录 A 技术原理	- 30 -
附录 B 单细胞加载和分离	- 33 -
附录 C Barcode Beads 加载	- 33 -
附录 D Barcode Beads 取出和回收	- 33 -
附录 E 测序	- 34 -

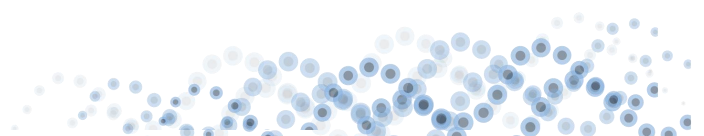
1. 基本信息

1.1 产品概述

GEXSCOPE®单细胞转录组建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®单细胞转录组建库试剂盒使用 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 sCellLiVE 组织分离试剂盒和 PythoN 仪器可以从组织中产生高质量的单细胞悬浮液。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 (2 RXNs) 和
GEXSCOPE® Single Cell RNA Library Kit Cell HD(2 RXNs)

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

收到试剂盒后, 请及时保存在-25~-15℃。

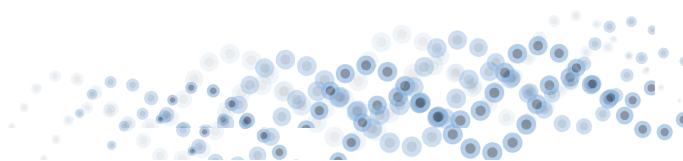
组分	SD		HD		管盖颜色
	数量	体积	数量	体积	
Lysis Buffer, Stock	1	1500 µL	1	1500 µL	绿色
RNase Inhibitor	1	50 µL	1	50 µL	绿色
100 mM DTT	1	400 µL	1	400 µL	绿色
RT Master Mix	1	400 µL	2	400 µL	紫色
Reverse Transcriptase	1	50 µL	2	50 µL	紫色
TS Primer	1	50 µL	1	50 µL	紫色
Amplification Master Mix	1	400 µL	2	400 µL	透明
A Primer Mix	1	200 µL	1	200 µL	透明
Amplification Enzyme	1	20 µL	2	20 µL	透明
Fragmentation Buffer V3	1	17 µL	1	17 µL	橙色
Fragmentation Enzyme Mix V3	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 v3	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

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 V3	1	1.8 mL	—	—	黑色
Barcode Beads HD V3	—	—	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 (16 RXNs) 和

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

Box 1: SCOPE–chip SD/HD

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 or Barcoding Beads HD

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 V3	8	1.8 mL	–	–	黑色
Barcode Beads HD V3	–	–	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 or

Single Cell Amplification Reagents HD

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

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 V3	1	135 µL	橙色
Fragmentation Enzyme Mix V3	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 V3	1	480 µL	白色

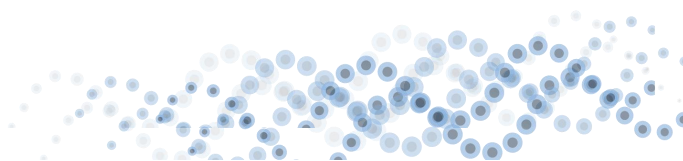
Box 5: Library Adapters

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^{2+} + Mg^{2+})
- 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
		Total: 7 - 8h	-20°C or -80°C for 3 months

图 1 工作流程和操作时间

4. 实验准备

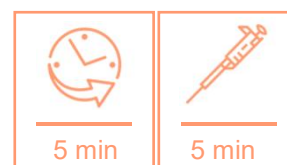
我们建议用户为所有需要无尘室条件的 PCR 前步骤建立一个“pre-PCR 区”。这些步骤包括组织解离、单细胞分离和 mRNA 捕获、反转录。对于 RNA 相关的工作，用 RNase Away(或同类产品)清洁所有工作台面和移液器。佩戴适当的口罩和实验室手套，以避免污染和 RNA 降解。

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

- 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 (μL)	2 RXNs (μL)
PBS	998	1996
10% Tween-20	2	4
Total	1000	2000

- 将微流控芯片置于干净的培养皿上，用 200 μL 的移液器吸取 200 μL 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 2 次。
5. 移除出样口处液体后，吸取 200 μ 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 μ 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：

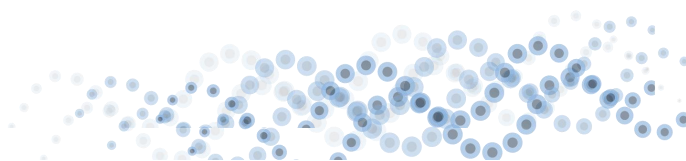
- Barcode Beads SD V3 或 HD V3 （黑色）

自备材料：

- DynaMagTM-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 μ 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（ DynaMagTM-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 μ 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。

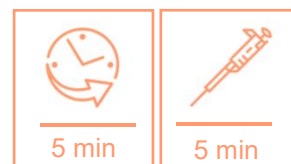


5. 单细胞分离和 mRNA 捕获

5.1 Lysis Mix 准备

准备材料:

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



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 (μL) $\times 1$	2 RXNs (μL) $\times 2.2$
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 (μL) $\times 1$	2 RXNs (μL) $\times 2.2$
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



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 μL 的 3.5×10^5 细胞/mL 悬液(右列)(35000 个细胞)来加载 SCOPE-chip

SCOPE-chip SD:

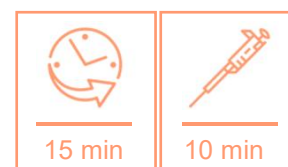
目标细胞捕获数	推荐的细胞悬液浓度
3000–5000	$(1.5-2.0) \times 10^5$ cells /mL
5000–7000	$(2.0-2.5) \times 10^5$ cells /mL
7000–9000	$(2.5-3.0) \times 10^5$ cells /mL
9000–10000	$(3.0-3.5) \times 10^5$ cells /mL

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 μL 移液器吸头
1. 移除进出样口多余液体，加 200 μL 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 μL (SD)/ 150 μL (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。

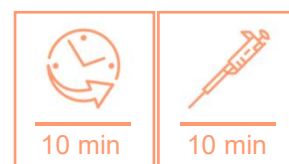
3. 静置 5min 使细胞落入微孔内，静置期间可在显微镜下观察细胞落入微孔情况。
4. 待细胞落入微孔内，吸取 200 μ L PBS 缓慢匀速（约 30s）注入芯片冲洗掉多余细胞，立即移除出样口液体。
5. 重复 1 次步骤 4，冲洗掉留在表面未落入微孔内的细胞。
6. 在显微镜下观察芯片通道内表面黏附的多余细胞是否去除干净，若还有残留，可继续加 PBS 冲洗（冲洗时应缓慢匀速，避免气泡引入）。
7. （选做）在显微镜下拍照计数各视野的细胞数，记录数据。

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 μ L 移液器吸头
1. 吸取 80 μ 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 μ 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 μ 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。

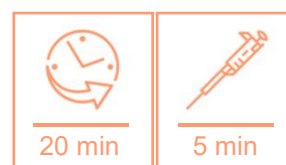
5.5 细胞裂解和 mRNA 捕获

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 μ L 移液器吸头
1. 吸取 100 μ L (SD) 或 150 μ 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 15 min 用于裂解细胞并释放 mRNA，让 Barcode Beads 捕获 mRNA。



5.6 取出 Barcode Beads

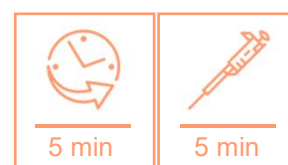
(详细的图片工作流程和视频手册链接见附录 D)

准备材料：

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

自备材料：

- 200 μ 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 μ 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 μ L 移液器吸头插入进样口，吸取 200 μ 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。



图 3 Barcode Beads 取出示意图

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

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
 - DynaMagTM-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 (μL) $\times 1$	2 RXNs (μL) $\times 2.2$
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 (μL) $\times 1$	2 RXNs (μL) $\times 2.2$
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

- 将收集 Barcode Beads 的离心管短暂离心后置于 1.5mL 规格磁力架 (DynaMagTM-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。
- 从磁力架上取下离心管, 加入 500 μL 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。
- 取下离心管, 短暂离心后再置于磁力架上, 用 20 μL 的移液器吸取残余的液体。只留下离心管底部的 Barcode Beads。
- 迅速取下离心管, 加入 200 μL (SD 芯片) / 400 μL (HD 芯片) 配好的 RT Mix, 并吹打混匀。
- 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
- DynaMagTM-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℃。

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

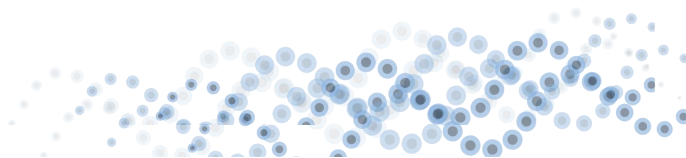
PCR Mix (SCOPE–chip SD):

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
Total	400	880

PCR Mix (SCOPE–chip HD):

组分	1 RXN (μL) ×1	2 RXNs (μL) ×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
Total	800	1760

3. 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 μL (SD 芯片) / 800 μL (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 μL (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 μL 。
- 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。

- 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 μL , 则加入 $0.6 \times 400 = 240 \mu\text{L}$ 纯化磁珠。

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。

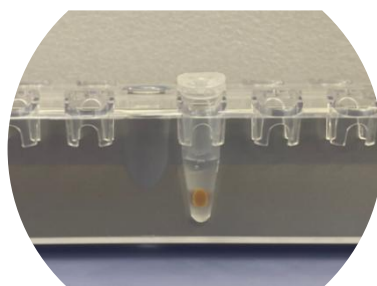


图 4 AMPure Beads 在磁力架上吸附示意图

3. 保持离心管始终处于磁力架上，加入 800 μ 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 μ 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 1.5 mL 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。

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。

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 μ 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：
(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 μ 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

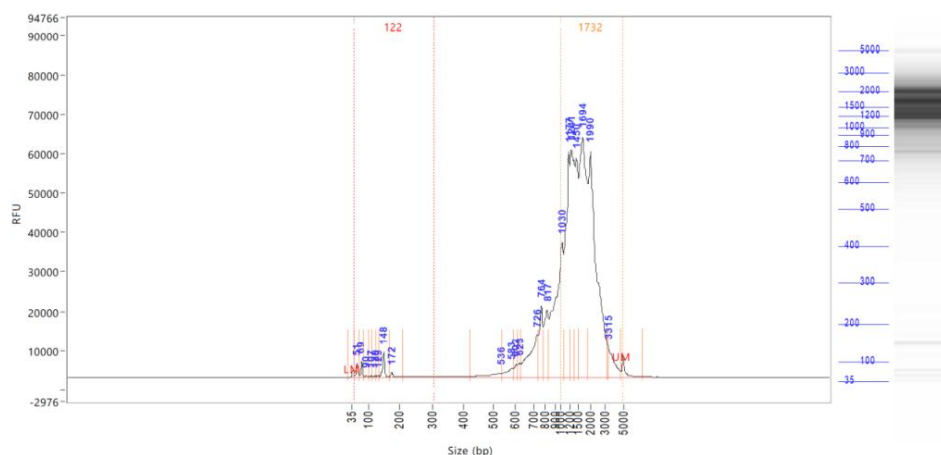


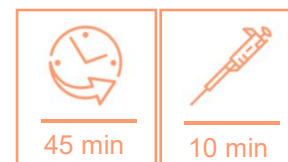
图 5 cDNA 片段分布示意图

7. 转录组文库构建

7.1 片段化

准备材料：

- Fragmentation Buffer V3 (橙色) ；
- Fragmentation Enzyme Mix V3 (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 μ 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 μ L
Step	Temperature	Time
1	37 $^{\circ}$ C	10 min
2	65 $^{\circ}$ C	30 min
3	4 $^{\circ}$ C	Hold

2. 室温解冻 Fragmentation Buffer V3，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 V3 涡旋振荡（5–8 秒）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：

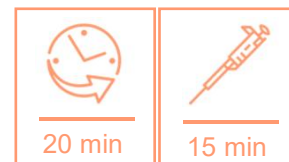
组分	体积 (μ L)
Diluted cDNA (10ng 或 50ng)	Variable
1×TE	Variable
Fragmentation Buffer V3	7
Fragmentation Enzyme Mix V3	2
Total	35

- 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 70 μ L，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：70 μ L
Step	Temperature	Time
1	20 $^{\circ}$ C	15 min
2	4 $^{\circ}$ 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 (μ 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。

- 涡旋混匀并瞬离。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™-PCR 磁力架/492025/Invitrogen

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. 每个反应准备 0.5mL 80%乙醇和 25μL 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，加入 AMPure XP 纯化磁珠体积为 PCR 扩增产物总体积的 0.2x（例如：片段化产物体积为 68.5 μL，则应使用 0.2 x 68.5=13.7 μL AMPure XP 纯化磁珠）。涡旋 15s 混匀后，室温孵育 5min。
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 200μL 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。

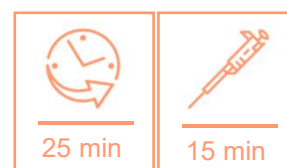
- 从磁力架上取下纯化磁珠所在 PCR 管，短暂离心，再次置于磁力架上，吸去多余酒精，开盖晾干磁珠 2min（不要超过 5min）。
- 将纯化磁珠所在 PCR 管从磁力架上取下，加入 17 μ L 0.1 $\times$ TE，涡旋振荡 15s 混匀磁珠，室温孵育 5min。
- 将纯化磁珠所在 PCR 管短暂离心后置于磁力架上，使磁珠与液体分离，待溶液澄清后（约 5min），小心吸取 15 μ L 上清至新的灭菌 PCR 管中用于步骤 7.4 PCR 富集。

注意：此步骤结束后可以将样品于 4℃ 保存 72 小时，-20℃ 保存一周。

7.4 PCR 富集

准备材料：

- Library Amp Mix V3（白色）；
 - Indexing Primer Mix（白色）；
 - 步骤 7.3 的接头连接后纯化产物。
- 提前按照下表设置 PCR 富集程序，并使 PCR 仪热盖保持在 105℃，反应体积 50 μ L。



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

- 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（ μ L）
接头连接纯化后产物（步骤 7.3 产物）	15
Library Amp Mix V3	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. 每个反应准备 0.5mL 80%乙醇。将产物 PCR 管短暂离心，用移液器测量体积，并用 NF 水补齐至 50μL。取 25μL 磁珠加入到 PCR 产物中，涡旋混匀，室温孵育 5min。
2. 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。
3. 涡旋振荡混匀磁珠并吸取 7.5μL 加入至上清中，涡旋振荡充分混匀，室温孵育 5min。
4. 将 PCR 管短暂离心后置于磁力架上，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。

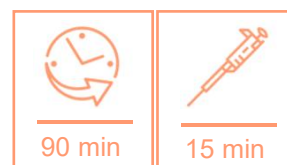
5. 保持 PCR 管始终处于磁力架上，加入 200 μ L 新鲜配制的 80% 乙醇漂洗磁珠。室温孵育 30s，小心移除上清。
6. 重复步骤 6，总计漂洗 2 次。
7. 从磁力架上取下 PCR 管，短暂离心，再次置于磁力架上，吸去多余酒精，开盖晾干磁珠 1min（不要超过 2min）。
8. 将 PCR 管从磁力架上取出，加入 20 μ L Buffer EB 洗脱。涡旋振荡 15s 混匀纯化磁珠，室温孵育 5min。
9. 将 PCR 管短暂离心并置于磁力架上，使纯化磁珠与液体分离，待溶液澄清后（约 5min）小心吸取 18 μ L 上清至新的灭菌 1.5mL 离心管中。

重要提示：此步骤结束后可以将样品于-20℃或-80℃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 μ 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

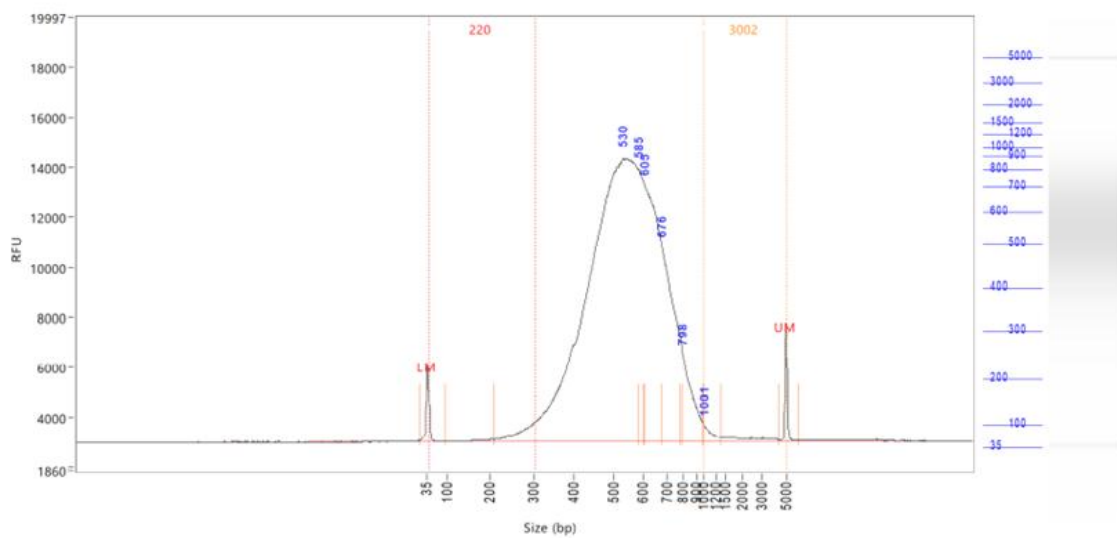


图6 文库质检图

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。

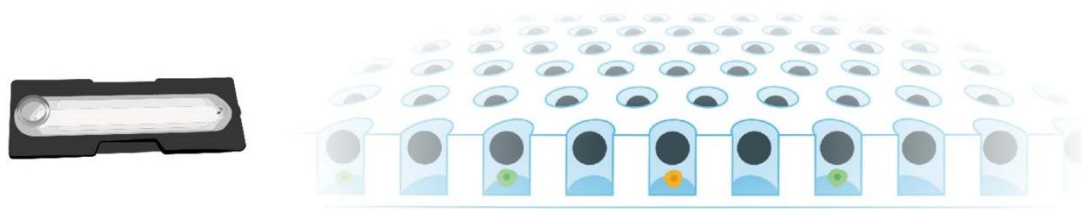
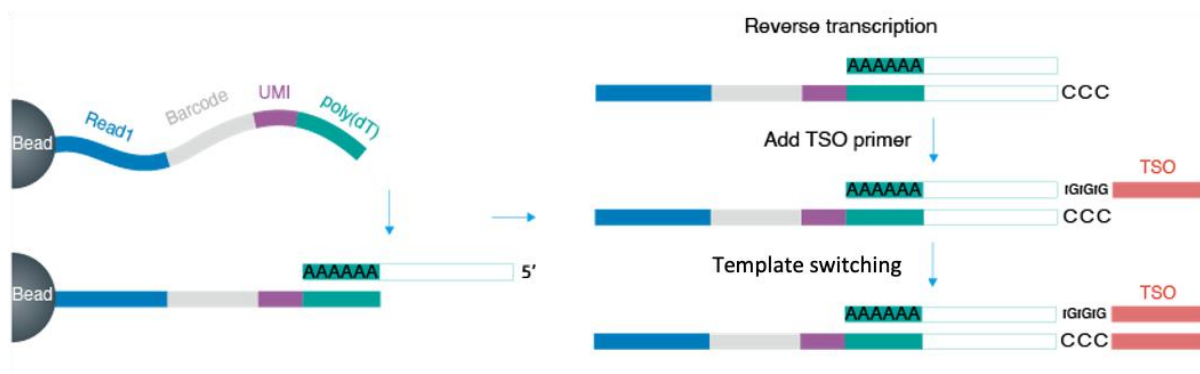


图 A1: SCOPE-chip®微流控芯片外形（左）及细微结构（右）

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。

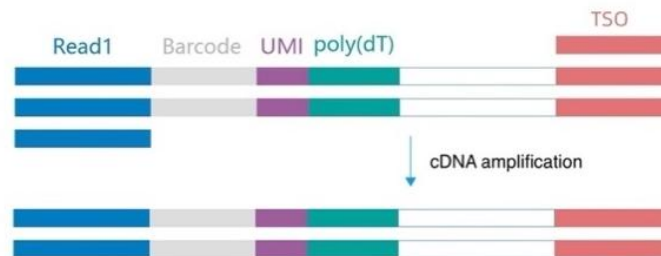


图 A3: cDNA 富集扩增原理图

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。

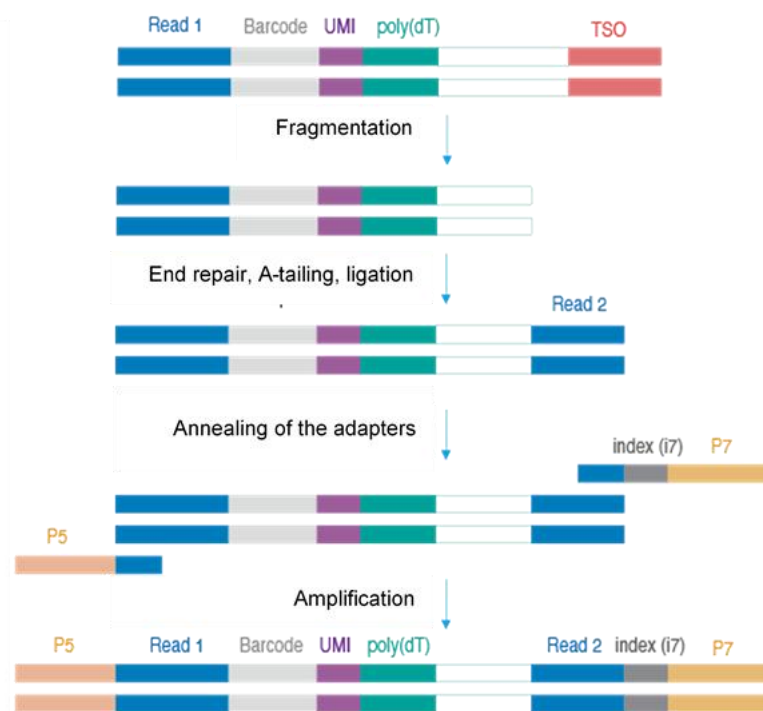


图 A4: 转录组文库构建原理图

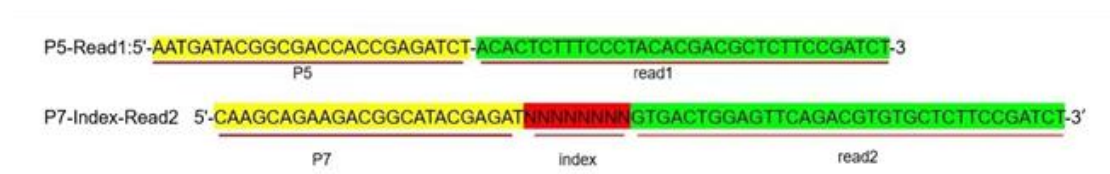


图 A5: 转录组 illumina 文库结构图 (左右两侧序列)

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：

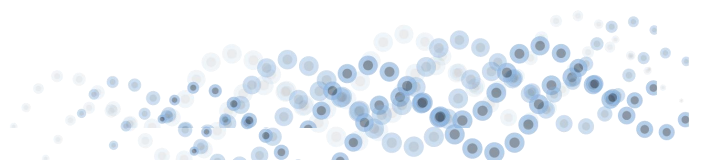
<https://youtu.be/6Lg6aySKA3o>



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



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

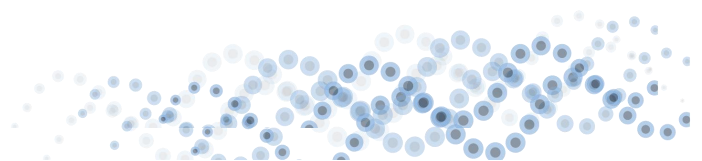
- 外周血单核细胞(PBMC)或淋巴细胞每个细胞 30,000 reads。
- 其他细胞类型，每个细胞 50,000reads。

测序模式

测序	循环数
Read 1*	150
i7 Index	8
Read 2 [#]	150

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

[#]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

Email: tech-support@singleron.bio

Website: www.singleron.bio

Singleron Biotechnologies Inc

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

Email: info@singleronbio.com

Email: tech-support.usa@singleron.bio

Website: www.singleron.bio