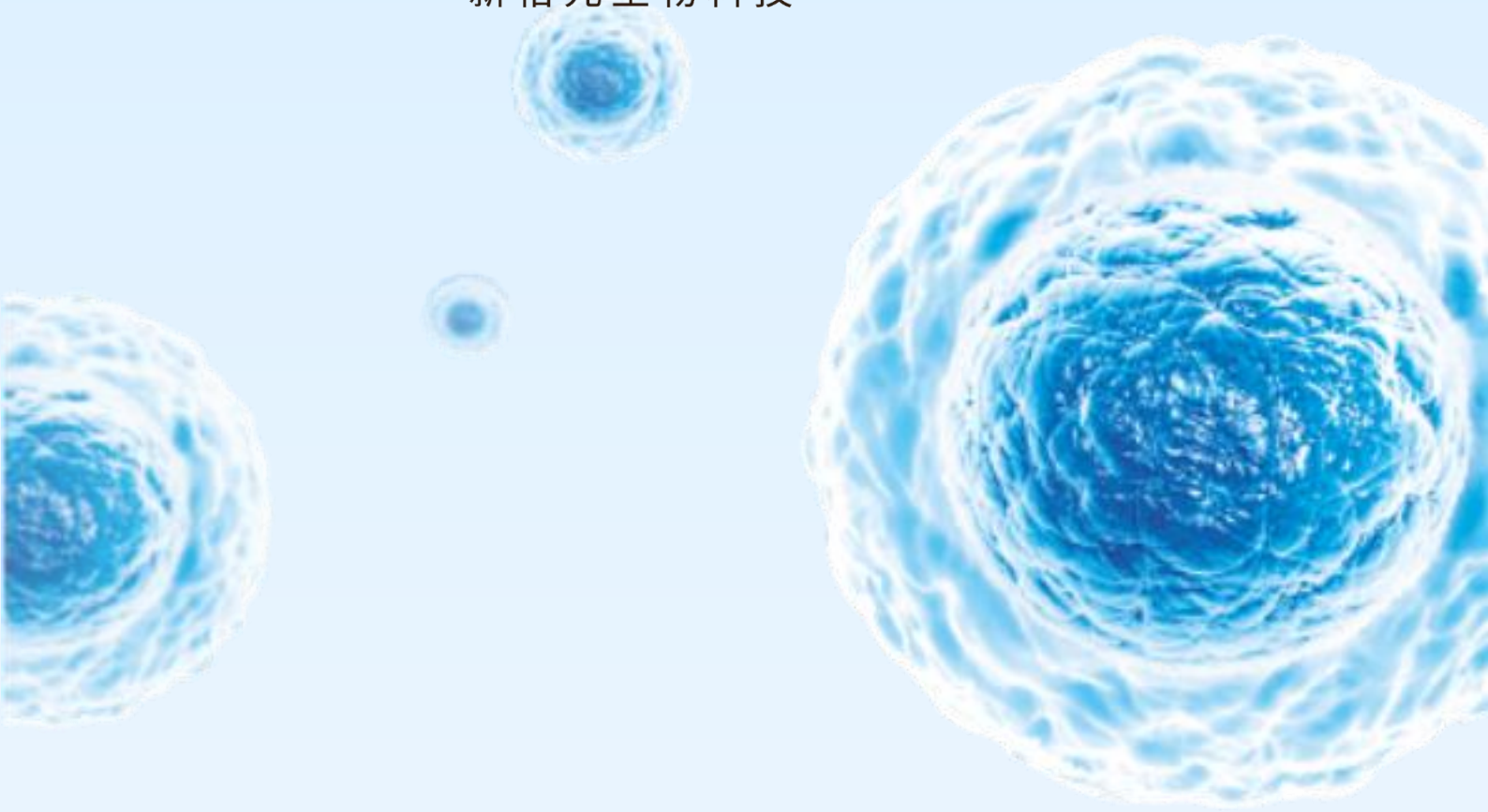


Singleron
新格元生物科技



GEXSCOPE[®] Microbial Single Cell RNA Library Kit HD (Yeast)

微生物单细胞酵母试剂盒

RUO

仅供科研使用

2025.04

本手册适用于以下产品:

目录号	产品名称	规格
4161031	GEXSCOPE® Microbial Single Cell RNA Library Kit HD (Yeast)	2 RXNs
4161032	GEXSCOPE® Microbial Single Cell RNA Library Kit HD (Yeast)	16 RXNs

历史版本信息

版本信息	修改内容
2023/07	初版
2025/04	新增测序策略的附录，修改建库打断时间

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. 自备仪器试剂耗材	- 5 -
3. 工作流程和操作时间	- 7 -
4. 实验准备	- 8 -
4.1 微流控芯片准备	- 8 -
4.2 Barcode Beads 准备	- 9 -
5. 酵母细胞固定和复溶 (可选操作)	- 11 -
6. 酵母细胞分离和 mRNA 捕获	- 13 -
6.1 Lysis Mix 的准备	- 13 -
6.2 酵母单细胞悬液的制备	- 13 -
6.3 注入酵母细胞	- 14 -
6.4 注入 Barcode Beads	- 15 -
6.5 酵母细胞裂解和 mRNA 捕获	- 16 -
6.6 取出 Barcode Beads	- 16 -
7. 反转录及 cDNA 合成	- 18 -
7.1 反转录	- 18 -
7.2 cDNA 扩增	- 19 -
7.3 cDNA 纯化	- 21 -
7.4 cDNA QC	- 22 -
8. 文库制备	- 24 -
8.1 片段化	- 24 -
8.2 接头连接	- 25 -
8.3 接头连接后产物纯化	- 26 -
8.4 PCR 扩增	- 27 -

8.5 扩增产物片段分选	- 28 -
8.6 文库质检	- 29 -
附录 A: 技术原理	- 32 -
附录 B: 常见问题解答	- 35 -



1. 基本信息

1.1 产品概述

GEXSCOPE® 微生物单细胞酵母试剂盒可提供从单细胞分离、核酸捕获到单细胞测序文库构建的全流程酵母单细胞转录组测序解决方案，适用于新鲜和固定化的酵母样本。

GEXSCOPE® 微生物单细胞酵母试剂盒搭载 SCOPE-chip 微流控芯片，该芯片可用于快速、集成式完成酵母细胞分离、酵母裂解、mRNA 分子捕获和分子标记等实验步骤。SCOPE-chip 微流控芯片操作简便，可适用于绝大多数酵母细胞类型，无细胞偏好性。

1.2 产品组成

以下适用于 GEXSCOPE® Microbial Single Cell RNA Library Kit HD (Yeast)(2 RXNs)

Box 1: Single Cell RNA Amplification HD& Library Reagents Yeast

收到试剂盒后，请及时保存在-25~-15℃。

组分	数量	体积	管盖颜色
Microbial Lysis Enzyme	1	20 µL	黄色
Lysis Buffer, Stock	1	1500 µL	绿色
RNase Inhibitor	1	50 µL	绿色
100 mM DTT	1	400 µL	绿色
RT Master Mix	2	400 µL	紫色
Reverse Transcriptase	2	50 µL	紫色
TS Primer	1	50 µL	紫色
Amplification Master Mix	2	400 µL	透明
A Primer Mix	1	200 µL	透明
Amplification Enzyme	2	20 µL	透明
Fragmentation Buffer V3	1	17 µL	橙色
Fragmentation Enzyme Mix V3	1	6 µL	橙色
1×TE	1	800 µL	橙色
Ligation Mix	1	72 µL	蓝色
Ligation booster	1	4 µL	蓝色
Adaptor	1	50 µL	蓝色
Library Amp Mix V3	1	60 µL	白色
Indexing Primer Mix1(ATCACGTT)	1	30 µL	白色
Indexing Primer Mix2(CGATGTTT)	1	30 µL	白色

Box 2: SCOPE-chip HD & Barcoding Beads

收到试剂盒后，请及时保存在 2~8℃。

组分	数量	体积	管盖颜色
Barcode Beads HD V3	1	1.8 mL	黑色
Wash Buffer A	1	7 mL	白色
Wash Buffer B	1	1.8 mL	白色
Singleron Magnetic Rack	1	—	—
SCOPE-chip HD	2	—	—

以下适用于 GEXSCOPE® Microbial Single Cell RNA Library Kit HD (Yeast)(16 RXNs)

Box 1: SCOPE-chip HD

收到试剂盒后，请及时保存在 2~35℃。

组分	数量
SCOPE-chip HD	16
Singleron Magnetic Rack	4

Box 2: Barcoding Beads HD

收到试剂盒后，请及时保存在 2~8℃。

组分	数量	体积	管盖颜色
Barcode Beads HD V3	8	1.8 mL	黑色
Wash Buffer A	8	7 mL	白色
Wash Buffer B	6	1.8 mL	白色

Box 3: Single Cell RNA Amplification Reagents Yeast HD

收到试剂盒后，请及时保存在-25~-15℃。

组分	数量	体积	管盖颜色
Microbial Lysis Enzyme	3	54 µL	黄色
Lysis Buffer, Stock	2	1500 µL	绿色
RNase Inhibitor	1	300 µL	绿色
100 mM DTT	1	400 µL	绿色
RT Master Mix	4	1500 µL	紫色
Reverse Transcriptase	2	400 µL	紫色
TS Primer	2	250 µL	紫色
Amplification Master Mix	4	1600 µL	透明
A Primer Mix	2	750 µL	透明
Amplification Enzyme	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 μ L	橙色
Fragmentation Enzyme Mix V3	1	40 μ L	橙色
1 $\times$ TE	1	800 μ L	橙色
Ligation Mix	1	576 μ L	蓝色
Ligation booster	1	20 μ L	蓝色
Adaptor	1	50 μ L	蓝色
Library Amp Mix V3	1	480 μ L	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 μ L	白色
Indexing Primer Mix2 (CGATGTTT)	1	30 μ L	白色
Indexing Primer Mix3 (TTAGGCAT)	1	30 μ L	白色
Indexing Primer Mix4 (TGACCACT)	1	30 μ L	白色
Indexing Primer Mix5 (ACAGTGGT)	1	30 μ L	白色
Indexing Primer Mix6 (GCCAATGT)	1	30 μ L	白色
Indexing Primer Mix7 (CAGATCTG)	1	30 μ L	白色
Indexing Primer Mix8 (ACTTGATG)	1	30 μ L	白色

2. 自备仪器试剂耗材

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
- RNase inhibitor (40 U/μl) (可选, 如样本为需复溶固定后的酵母细胞时需使用)
- 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+})
- 10 % Tween-20

cDNA 扩增和测序文库构建 (PCR 后实验)

- 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

实验流程	实验阶段	实验耗时	暂停点
固定化酵母细胞复溶 (仅限于固定化样本)	PCR前实验	40min	
单细胞分离		1h	
mRNA捕获			
逆转录		1.5 - 2h	
cDNA扩增和质检	PCR后实验	1.5 - 2h	可4°C 过夜
文库构建及质检		3h	可4°C保存48h或 -20°C保存一周
		Total: 7 - 9h	可-20°C或-80°C保 存3个月

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”。这些步骤包括固定化酵母的复溶、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)清洁所有工作表面和移液器。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 QC。

4.1 微流控芯片准备

准备材料:

- SCOPE-chip HD。

自备材料:

- PBS 缓冲液;
- 0.02%PBST (PBS 中包含 0.02%Tween-20) ;
- 无水乙醇;
- 不同量程单通道移液器; 干净的培养皿

- 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 SCOPE-chip 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 无水乙醇从进样口缓慢注入芯片，时间控制在 10s。用移液器来回抽吸芯片中无水乙醇，以尽可能排除微流控芯片中的气泡。

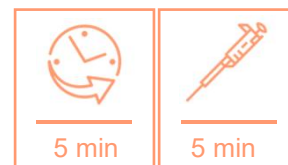




图 2 微流控芯片液体注入和移除示意图

3. 用移液器吸除出液口乙醇，此过程不要接触出液口小孔（在出液口处施加的吸力可能会导致 SCOPE-chip 微流控芯片中引入空气）。
4. 用无水乙醇重复冲洗芯片 2-3 次。
5. 用 200 μ L 的移液器吸取 200 μ L PBST，从进液口缓慢注入芯片，时间控制在 10s，避免产生气泡。
6. 用移液器吸除出液口液体，此过程不要接触出液口小孔。
7. 重复用 PBST 冲洗芯片 2 次。
8. 用移液器吸除出液口液体，保证出液口留有少量液体。
9. 将预处理完成的 SCOPE-chip 微流控芯片放到干净培养皿中备用，避免灰尘污染。如立即开始后续实验可将培养皿置于室温，如短时间内不开展后续实验可将培养皿置于 4 $^{\circ}$ C 过夜保存。

4.2 Barcode Beads 准备

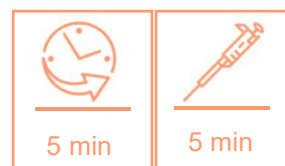
准备材料:

- Barcode Beads（黑色）。

自备材料:

- DynaMag™-2mL 磁力架
- PBS

1. 清洗 Barcode Beads：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。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; 用移液器充分吹打混匀 Barcode Beads, 确保 Barcode Beads 充分重悬。

2. 取下离心管, 用 PBS 重悬定容至 60 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. 酵母细胞固定和复溶（可选操作）

自备材料:

- 低温冷冻离心机
- 细胞计数仪/倒置显微镜
- 80%甲醇
- PBS
- BSA (20mg/mL)
- Actinomycin D (2mg/mL 溶于 DMSO)
- RNase Inhibitor (40 U/μL)



注意：如实验样本为新鲜酵母细胞，请从第 6 章开始

酵母细胞可通过如下步骤进行固定 1:

1. 用冷冻离心机 1640 x g， 4℃离心 1min，收集酵母细胞。
2. 移除上清。短暂离心后，用移液器尽可能吸净残留液体。
3. 用移液管立即吸取 3 mL 预冷的 80%甲醇重悬细胞。固定后的酵母细胞可置于-20℃保存 6 h 或置于-80℃保存 6 个月。

固定后的酵母细胞需先按照如下步骤进行复溶¹，才能用 SCOPE-chip 微流控芯片进行细胞分离。

1. 将固定化的酵母细胞置于冰上平衡 15 min。
2. 按照如下表配置复溶 Mix，涡旋混匀仪混匀后，用掌上离心机短暂离心，置于冰上备用。

复溶 Mix 的配置:

组分	1 RXN (μL)	2 RXNs (μL)
PBS	1981.5	4359.3
BSA (20 mg/mL)	2.5	5.5
RNase inhibitor (40 U/μL)	10	22
Actinomycin D	6	13.2
Total	2000	4400

3. 将平衡后的酵母细胞置于冷冻离心机，1640 x g, 4℃离心 2min 收集细胞。
4. 吸除上清。将离心管至于冰上，加入 700 μ L 复溶 Mix，用移液器吹打混匀，重悬细胞。
5. 将离心管置于冷冻离心机，1640 x g, 4℃离心 2min 收集细胞。
6. 重复用 700 μ L 复溶 Mix 清洗细胞一次。吸除上清，用 500 μ L 复溶 Mix 重悬细胞。
7. 将重悬后的细胞至于冰上 15min.
8. 立即开始第 6 步的酵母细胞分离和 mRNA 捕获实验。

注意：固定细胞复溶后需尽快进行后续实验。

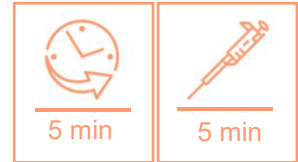


6. 酵母细胞分离和 mRNA 捕获

6.1 Lysis Mix 的准备

准备材料:

- Microbial Lysis Enzyme (黄色) ;
- Lysis Buffer, Stock(绿色) ;
- 100mM DTT (绿色) ;
- RNase Inhibitor(绿色)。



体系配制：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:

Component	1 RXN (μL) ×1	2 RXNs (μL) ×2.2
Lysis Buffer, Stock	139	305.8
100mM DTT	8	17.6
RNase Inhibitor	4	8.8
Microbial Lysis Enzyme	9	19.8
Total	160	352

6.2 酵母单细胞悬液的制备

准备材料:

- 酵母细胞悬浮液（来源于步骤 5）



自备材料:

- PBS
- 血球计数板
- 倒置显微镜

注意： 如使用新鲜的酵母细胞，需使用 PBS 清洗 2 次。

1. 使用显微镜和血球计数板计算酵母细胞浓度。
2. 用预冷的 PBS 溶液，按照目标捕获细胞数加入适量细胞，如下表：用 PBS 将细胞悬液稀释至 $3 \times 10^5 - 7 \times 10^5$ cells/mL 即可用于芯片实验。

预期捕获酵母细胞数	建议上样细胞浓度
12000-15000	$(3.0 - 4.0) \times 10^5$ cells/mL
15000-18000	$(4.0 - 5.0) \times 10^5$ cells/mL
18000-24000	$(5.0 - 6.0) \times 10^5$ cells/mL
24000-30000	$(6.0 - 7.0) \times 10^5$ cells/mL

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 上捕获 12,000 个细胞(左列)，需要 150 μ L 的 3.0×10^5 细胞/mL 悬液(右列)(45000 个细胞)来加载 SCOPE-chip。

6.3 注入酵母细胞

准备材料:

- 经过预处理的微流控芯片 HD (来源于步骤 4.1)
- 经过浓度调节的酵母单细胞悬液 (来源于步骤 6.2)

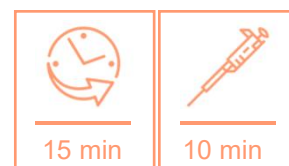
自备材料:

- PBS
 - 200 μ L 移液器吸头
1. 移除进出样口多余液体，加 200 μ 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 150 μ L 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。

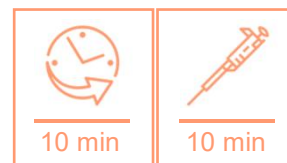


- 待细胞落入微孔内，吸取 200 μ L PBS 缓慢匀速（约 30s）注入芯片冲洗掉多余细胞，立即移除出样口液体。
- 重复 1 次步骤 4，冲洗掉留在表面未落入微孔内的细胞。
- 在显微镜下观察芯片通道内表面黏附的多余细胞是否去除干净，若还有残留，可继续加 PBS 冲洗（冲洗时应缓慢匀速，避免气泡引入）。
- （选做）在显微镜下拍照计数各视野的细胞数，记录数据。

6.4 注入 Barcode Beads

准备材料:

- 包含酵母细胞的 SCOPE-chip 微流控芯片 HD (来源于上一步)
- 预处理后的 Barcode Beads (来源于步骤 4.2)



自备材料:

- PBS
 - 200 μ L 移液器吸头
- 吸取 60 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。
 - 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。
 - 吸取 200 μ L PBS 缓慢匀速注入芯片（约 30s）。
 - 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)。
 - 重复 2 次步骤 3，以去除多余 Barcode Beads。
 - 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。

6.5 酵母细胞裂解和 mRNA 捕获

准备材料:

- 上一个步骤中包含细胞和磁珠的 SCOPE-chip HD (来源于上一步)
- 配好的 Lysis Mix (来源于步骤 6.1)

自备材料:

- 200 μ L 移液器吸头
1. 吸取 150 μ L 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。



6.6 取出 Barcode Beads

准备材料:

- SCOPE-chip 微流控芯片 HD (来源于上一步)
- Singleron Magnetic Rack
- Wash Buffer A

自备材料:

- 200 μ L 移液器吸头
1. 提前取 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。
 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。

7. 反转录及 cDNA 合成

7.1 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:

组分	1 RXN (μL) ×1	2 RXNs (μL) ×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 (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。
3. 从磁力架上取下离心管, 加入 500μL 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 20μL 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 400μL 好的 RT Mix, 并吹打混匀。
6. 置于提前设置好的金属浴中, 42℃, 转速 1300 rpm, 反应 90min (提前预热)。

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

7.2 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°C		Reaction Volume 50µL	
步骤		温度	时间
1		95°C	3 min
2	cycles = 4	98°C	20 sec
		65°C	45 sec
		72°C	3 min
		98°C	20 sec
3		67°C	20 sec
cycles = 11		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:

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。
4. 将离心管从磁力架上取下，向管中加入 800 µL 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 50µL（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。

5. 盖好八联排管管盖，置于 PCR 仪中进行扩增，设置热盖温度 105°C，反应体积 50µL。
6. PCR 程序运行结束后，可将扩增产物在 4°C 保存 48h 和 -20 °C 保存一周，或者直接进行 cDNA 扩增纯化。

7.3 cDNA 纯化

准备材料:

- 上一步扩增后的 cDNA。



自备材料:

- 1.5mL 离心管;
- 新鲜配制的 80%乙醇;
- Nuclease-free water;
- 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 4 mL 80%乙醇。将 PCR 扩增产物收集到 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 μ L, 则加入 $0.6 \times 400 = 240\mu$ 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 离心管中,暂留。

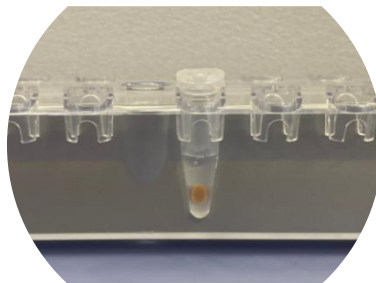


图 4 AMPure Beads 在磁力架上吸附示意图

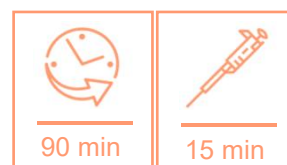
3. 保持离心管始终处于磁力架上,加入 800 μ L 新配制的 80% 乙醇漂洗磁珠。室温孵育 30s,小心移除上清。

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. 吸取同一样本的两个 1.5 mL 离心管中上清液合并至一个新的 1.5mL 离心管中，即为纯化产物。
8. 样品于 4℃可保存 72h，在-20℃可保存一周，或者可直接进行 cDNA 扩增纯化后的 QC 和定量。

7.4 cDNA QC

准备材料:

- 上一步纯化好的 cDNA (来源于步骤 7.3)



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. 取一份待测样品 (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. 取一份待测样品 (约 5ng), 用 Agilent Fragment Analyzer 5200 进行片段分布分析。
 3. 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%(如图 4)。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 < 40%	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

4. 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 100μL, 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

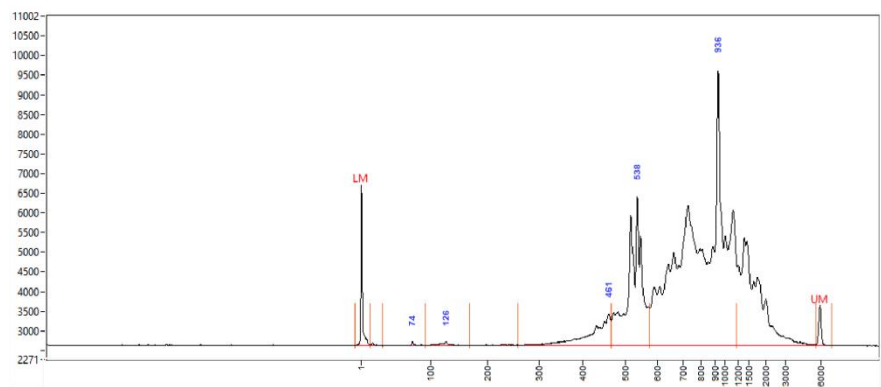
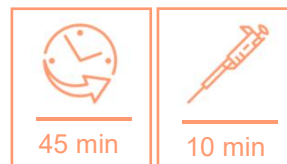


图 5 符合质控标准的 cDNA 片段的质控展示图

8. 文库制备

8.1 片段化



准备材料:

- Fragmentation Buffer V3 (橙色) ;
- Fragmentation Enzyme Mix V3 (橙色) ;
- 1×TE (橙色) ;
- 步骤 7.4 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
步骤	温度	时间
1	37 $^{\circ}$ C	10 min
2	65 $^{\circ}$ C	30 min
3	4 $^{\circ}$ C	Hold

- 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。
- 使用前将 Fragmentation Enzyme Mix V3 涡旋振荡（5–8 秒）并瞬离，置于冰上备用。
- 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。
- 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)
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。

8.2 接头连接

准备材料：



- Ligation Mix (蓝色)；
- Ligation Booster (蓝色)；
- Adaptor (蓝色)；
- 片段化产物 (来源于步骤 8.1)

- 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
步骤	温度	时间
1	20℃	15 min
2	4℃	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 (μL)
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. 涡旋混匀并瞬离。将反应管置于 PCR 仪中立即运行接头连接程序。

8.3 接头连接后产物纯化

准备材料:

- 步骤 8.2 的接头连接产物;
- 0.1×TE (使用 Nuclease-free Water 按 1:9 稀释 1×TE) (橙色)。

自备材料:

- Nuclease-free Water;
- AMPure XP 纯化磁珠;
- 新鲜配制的 80%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 DynaMagTM-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 μ L，则应使用 $0.2 \times 68.5 = 13.7 \mu$ L 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 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。
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 μ 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 μ L 上清至新的灭菌 PCR 管中用于步骤 8.4 PCR 富集。

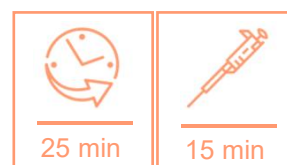
注意：此步骤结束后可以将样品于 4℃保存 72 小时，-20℃保存一周。

8.4 PCR 扩增

准备材料：

- Library Amp Mix V3（白色）；
- Indexing Primer Mix（白色）；
- 步骤 8.3 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℃，反应体积 50 μ L。



热盖温度: 105℃		反应体积: 50 μL
步骤	温度	时间
1	98℃	30 sec
2 (循环数参见下表)	98℃	10 sec
	65℃	75 sec
3	65℃	5 min
4	4℃	Hold

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

组分	体积 (μL)
接头连接纯化后产物 (Step 8.3 产物)	15
Library Amp Mix V3	25
Indexing Primer Mix	10
Total	50

注: Indexing Primer Mix 包括多种, 任意选择一种即可, 一个样本对应一个 Indexing Primer Mix。

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

8.5 扩增产物片段分选

准备材料:

- 步骤 8.4 的 PCR 富集产物。

自备材料:

- 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：

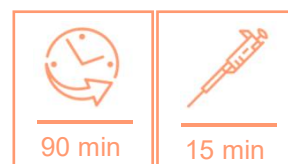
- AMPure XP 纯化磁珠需提前 30min 取出，恢复至室温后，方可使用。使用前需充分涡旋混匀。
- AMPure XP 纯化磁珠比较粘稠，应缓慢吸取和加入，确保吸取和加入的体积精准。否则将导致分选的片段长度与预期不一致。

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 纯化磁珠加入到 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 200μL 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 20μL Elution Buffer 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 18μL 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。

8.6 文库质检

准备材料：



- 步骤 8.5 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. 取一份待测样品（1 μ L）用 Qubit 4 荧光计测定浓度。
 2. 取一份待测样品（约 5ng）用 Agilent Fragment Analyzer 5200 或同等设备测定片段大小分布。
 3. 理想的文库应符合以下标准(如图 5):
 - a. 在分析区间设定为 300 bp 至 2000 bp 时,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,900bp-5000bp 占 比<10%	建议直接上机测序
风险	Qubit 检测总量>50ng，主峰 400b-700bp 之间，900bp-5000bp 占 比 10%-20%	可尝试风险上机测序
不合格	Qubit 值<50ng，主峰<400bp， 225bp-500bp 占比<30%	不建议上机测序

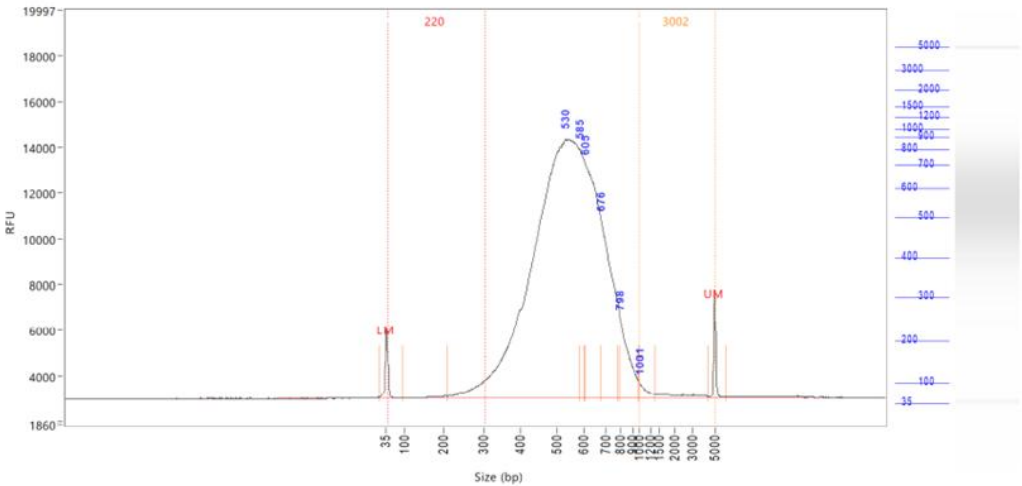


图 6 文库质检图

附录 A: 技术原理

酵母细胞分离和 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。

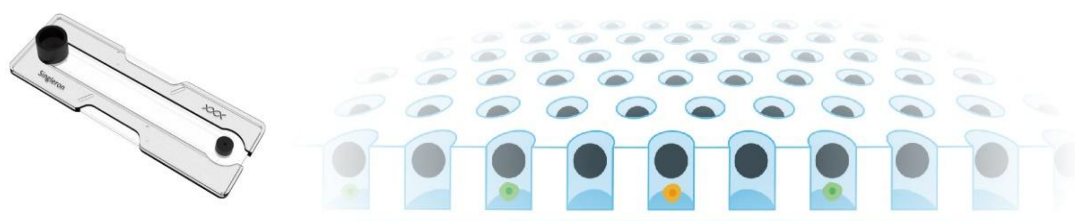


图 A1: SCOPE-chip®微流控芯片外形（左）及细微结构（右）

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。

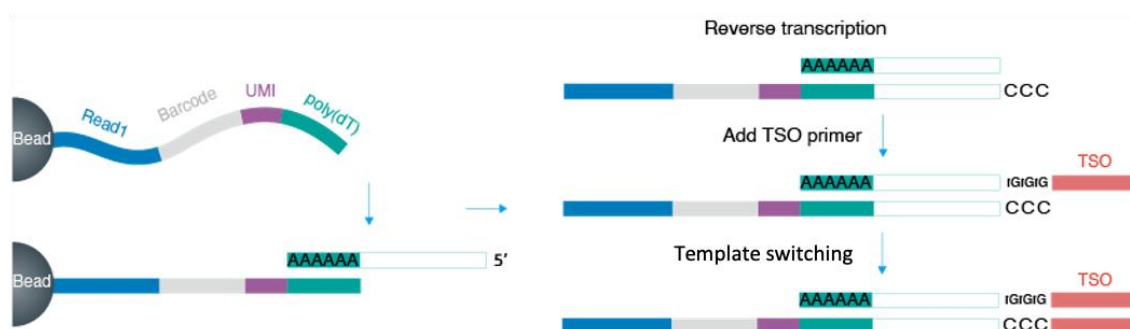


图 A2: 磁珠捕获 mRNA 及反转录原理图

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。

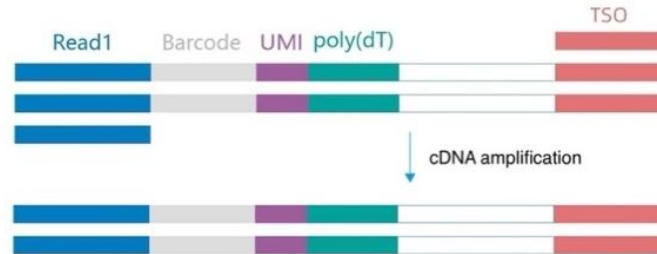


图 A3: cDNA 富集扩增原理图

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。

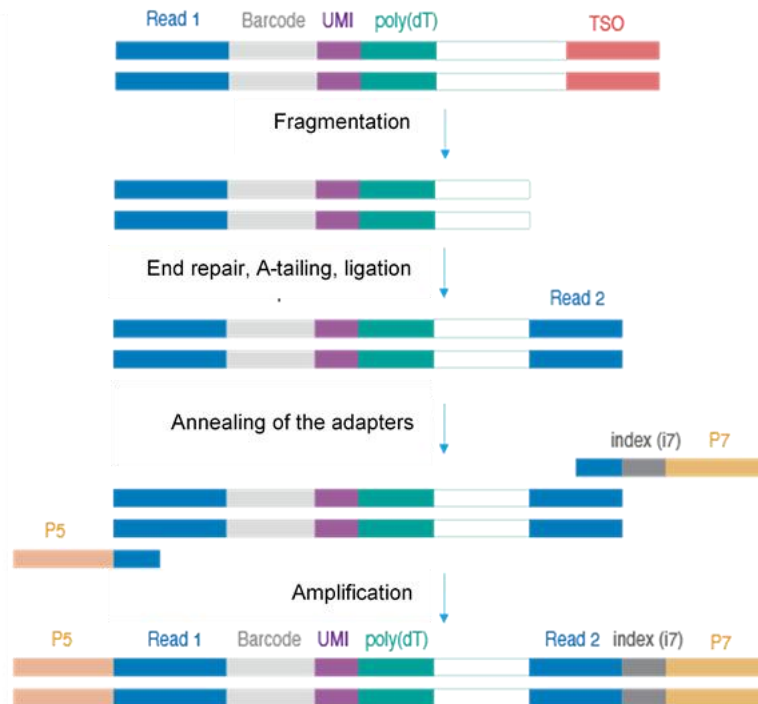


图 A4: 转录组文库构建原理图

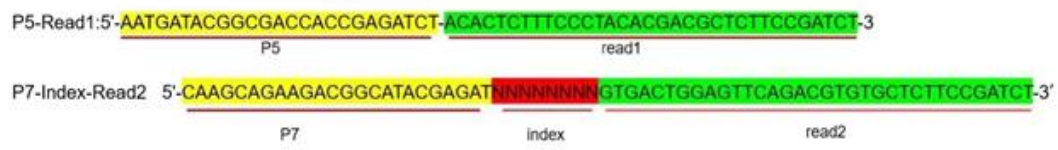


图 A5: 转录组 illumina 文库结构图 (左右两侧序列)

附录 B: 常见问题解答

1. 微生物单细胞酵母试剂盒的试剂组分与常规转录组试剂盒有什么区别？

答：微生物单细胞酵母试剂盒增加了用于酵母细胞壁裂解的 Microbial Lysis Enzyme。

2. 微生物单细胞酵母试剂盒能够捕获多少酵母细胞？

答：微生物单细胞酵母试剂盒使用新格元微流控微孔芯片（高密度版），可一次性捕获 500–30,000 个酵母细胞。

3. 酵母单细胞细胞悬液制备时，应该选取酵母生长曲线的哪个阶段？

答：选择指数增长期的酵母（OD 值=0.5~1），此时期的酵母活性较高。

4. 推荐上样酵母细胞数多少？

答：利用显微镜和血球计数板计算酵母细胞浓度，推荐酵母细胞浓度为 $3.0 \times 10^5 - 7.0 \times 10^5$ cells/mL，需要上样 150 μ L。

5. 酵母单细胞转录组测序推荐多少测序数据量？

答：推荐 25k reads/cell，如 6000 个细胞推荐 45G 测序数据量。

6. 此试剂盒适用于那种类型的酵母细胞？

该产品可用于新鲜或固定酵母，酿酒酵母已使用当前用户手册进行了验证。

7. 导致 cDNA 产量较低的原因？

- 酵母细胞投入量过低，没有达到最低上样要求
- 酵母细胞上样到芯片之前，没有充分混匀细胞
- 环境污染，导致 RNA 分子被降解

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）