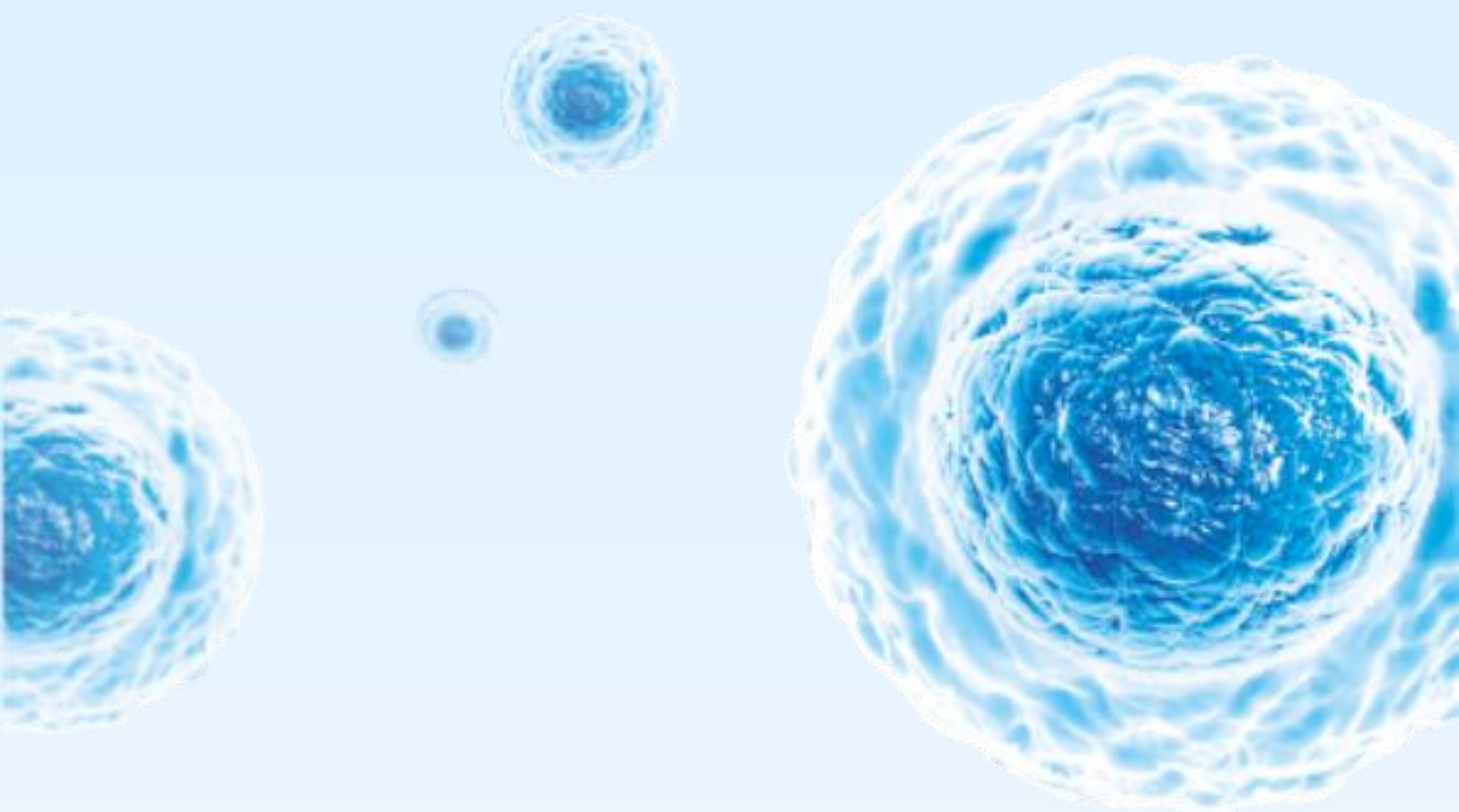




GEXSCOPE® Single Nucleus RNA Library Kit For NEO

单细胞核转录组建库试剂盒用户手册·NEO 版

本手册适用于以下产品：

目录号	产品名称	规格
11850251	GEXSCOPE® Single Nucleus RNA Library Kit for NEO	4 RXNs
11850221	GEXSCOPE® Single Nucleus RNA Library Kit for NEO	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.	仪器界面更新、产品变更

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 -
4.3 Nuclei Lysis Mix 准备	- 11 -
5. 细胞核解离	- 12 -
5.1 细胞核提取	- 12 -
5.2 细胞核悬液稀释	- 14 -
5.3 仪器操作	- 14 -
6. 反转录 cDNA 扩增	- 19 -
6.1 反转录	- 19 -
6.2 cDNA 扩增	- 20 -
6.3 cDNA 产物纯化	- 22 -
6.4 cDNA QC	- 23 -
7. 转录组文库构建	- 25 -
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	- 28 -
7.5 扩增产物片段分选	- 29 -
7.6 文库质检	- 31 -
附录 A 技术原理	- 33 -
单细胞核分离和 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 -
附录 B 测序	- 36 -

1. 基本信息

1.1 产品概述

GEXSCOPE®单细胞核转录组试剂盒可与 Singleron Matrix NEO®自动化单细胞测序文库构建系统配套使用，借助微流控微孔芯片快速完成成千上万个单细胞核分离和测序文库构建。通过对单细胞核测序文库信息的解读，可以在单细胞层面上了解每个细胞的基因表达信息，解析不同细胞间的异质性，从而以更高的分辨率认识生命现象。

GEXSCOPE®单细胞核转录组建库试剂盒可完成从单细胞核制备、单细胞核分离至测序文库构建全部流程。GEXSCOPE®单细胞核转录组建库试剂盒包括微流控微孔芯片，分子标签磁珠，扩增试剂及文库构建试剂。

本产品可高效无偏好性地完成反转录、cDNA 扩增及文库构建，显著提高测序文库产物得率及同等测序深度下的基因检出率，从而完成对数百至数万个细胞核中的 mRNA 进行测序。



1.2 产品组成

以下适用于：

GEXSCOPE® Single Nucleus RNA Library Kit for NEO (4 RXNs)

Box 1: Single Nucleus RNA Amplification NEO Chip& Library Reagents

收到试剂盒后，请及时保存在-25~-15℃。

组分	SD		管盖颜色
	数量	体积	
NucD lysis buffer	1	1500 µL	绿色
RNase Inhibitor	1	120 µL	绿色
100 mM DTT	1	400 µL	绿色
SN RT Master Mix	2	400 µL	紫色
Reverse Transcriptase	2	50 µL	紫色
TS Primer	2	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	2	17 µL	橙色
Fragmentation Enzyme Mix V3	2	6 µL	橙色
1× TE	1	800 µL	橙色
Ligation Mix	2	72 µL	蓝色
Ligation booster	2	4 µL	蓝色
Adaptor	1	50 µL	蓝色
Library Amp Mix V3	2	60 µL	白色
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

Box 2: NEO-Chip & Barcoding Beads & Nucleus Separation Solution

收到试剂盒后，请及时保存在 2~8℃。

组分	SD		管盖颜色
	数量	体积	
Barcode Beads SD V3	2	1.8 mL	黑色
Wash Buffer A	2	7 mL	白色
Wash Buffer B	2	1.8 mL	白色
Nucleus Separation Solution	4	1.2 mL	橙色
NEO Chip	4	—	—

以下适用于：

GEXSCOPE® Single Nucleus RNA Library Kit for NEO (16RXNs)

Box 1: NEO-Chip (NEO)

收到试剂盒后，请及时保存在 2~35℃。

组分	SD		管盖颜色
	数量	体积	
NEO-Chip SD	16	—	—

Box 2: Barcoding Beads SD

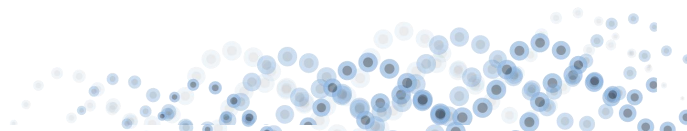
收到试剂盒后，请及时保存在 2~8℃。

组分	SD		管盖颜色
	数量	体积	
Barcode Beads SD 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 Nucleus Amplification Reagents SD

收到试剂盒后，请及时保存在-25~-15℃。

组分	SD		管盖颜色
	数量	体积	
NucD lysis buffer	2	1500 µL	绿色
RNase Inhibitor	1	440 µL	绿色
100 mM DTT	1	400 µL	绿色
SN RT Master Mix	2	1500 µL	紫色



Reverse Transcriptase	1	400 μ L	紫色
TS Primer	1	250 μ L	紫色
Amplification Master Mix	2	1600 μ L	透明
A Primer Mix	1	750 μ L	透明
Amplification Enzyme	1	160 μ L	透明

Box 4: Library Prep Reagents

收到试剂盒后，请及时保存在-25~-15℃。

组分	SD		管盖颜色
	数量	体积	
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

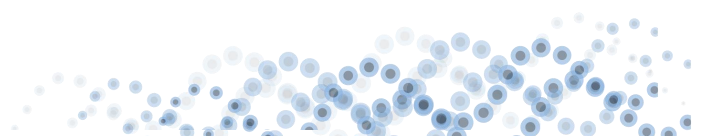
Box 6: Nucleus Separation Solution

收到试剂盒后，请及时保存在 2~8℃。

组分	SD		管盖颜色
	数量	体积	
Nucleus Separation Solution	16	1.2 mL	橙色

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
- 1mg 精度的电子秤
- 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

单细胞核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
- 40 μ m 细胞过滤网
- 医用眼科钳(10 厘米)和医用眼科剪刀
- 倒置显微镜
- 血球计数板
- 1×PBS (不含 Ca^{2+} Mg^{2+})
- DAPI 染液或 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

	步骤		时间	终止&保存
Pre-PCR station	细胞核准备		0.5-1h	
	试剂添加	NEO 仪器操作		Stop, $-80^{\circ}\text{C} \leq 48\text{h}$
	仪器运行		0.5-1h	
	完成制备和收样			
	反转录		1.5-2h	$4^{\circ}\text{C} \leq 15\text{h}$
Post-PCR station	扩增		1.5-2h	Stop, $4^{\circ}\text{C} \leq 72\text{h}$ or $-20^{\circ}\text{C} \leq 7\text{days}$
	建库		3h	Stop, $-20^{\circ}\text{C} \leq 30\text{days}$; or $-80^{\circ}\text{C} \leq 3\text{months}$
	全流程时长	7h-9h		

表 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”。这些步骤包括细胞核提取、单细胞核分离和 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。

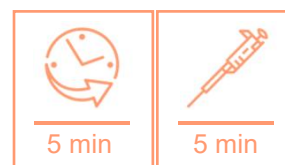
4.1 微流控芯片准备

准备材料：

- 微流控芯片。

自备材料：

- PBS 缓冲液；
- 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 (μ L)	2 RXNs (μ L)
PBS	998	1996
10% Tween-20	2	4
Total	1000	2000

2. 取出微流控芯片确认进样口与出样口，如图 1。

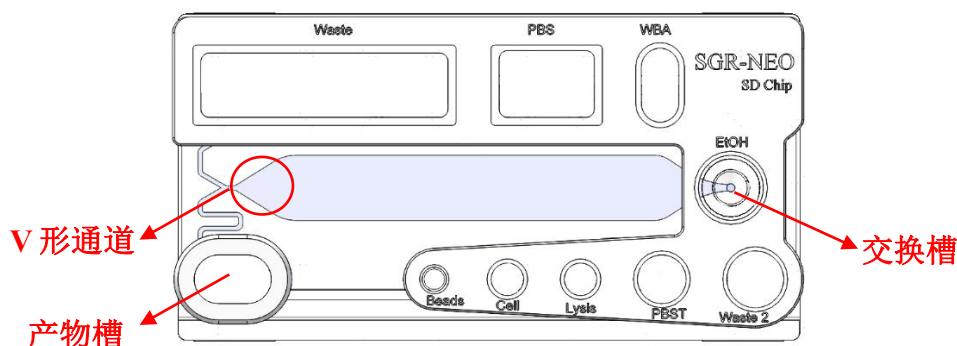


图 1 微流控芯片示意图

3. 将微流控芯片置于无菌的培养皿上，用移液器（200 μ L 量程）吸取无水乙醇从交换槽注入芯片，确保无水乙醇注满芯片通道且无白色气泡。

试剂名称	芯片类型	体积
无水乙醇	NEO Chip SD	105 μ L

注意：1) 在添加无水乙醇时，确保液体不会进入交换槽周围小孔内，在到达 V 形通道前停止。如果观察到无水乙醇进入到产物槽内，用移液器移除产物槽中的无水乙醇，并用 500 μ L Wash Buffer A 润洗产物槽 2 次。

2) 如果观察到通道内有白色气泡，请抽出无水乙醇，并注入新无水乙醇以排除气泡。

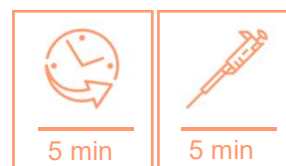
4.2 Barcode Beads 准备

准备材料：

- Barcode Beads SD 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。

4.3 Nuclei Lysis Mix 准备

准备材料：

- NucD lysis buffer (绿色)
- RNase Inhibitor (绿色)



1. 室温解冻 “NucD lysis buffer”，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。

Nuclei Lysis Mix (NEO-chip SD):

组分	1 RXN (μ L) $\times$ 1	2 RXNs (μ L) $\times$ 2.2
NucD lysis buffer	146.2	321.6
RNase Inhibitor	3.8	8.4
Total	150	330

5. 细胞核解离

5.1 细胞核提取

准备材料：

- Nucleus Separation Solution (橙色);
- 100mM DTT (绿色);
- RNase Inhibitor (绿色)。



自备材料：

- 15 mL 和 50 mL 锥形离心管;
- 1mg 精度的电子秤;
- 巴氏吸管;
- 兼容 15 mL 和 50 mL 锥形离心管的高速冷冻离心机;
- 医用眼科钳(10 厘米)和医用眼科剪刀;
- 40 μ m 细胞过滤网;
- DAPI 染液或 0.4% 台盼蓝染液;
- PBS;
- HBSS
- 10%BSA。

1. 按下表提前配制 Nucleus Separation Mix，涡旋混匀并瞬时离心。RNase Inhibitor 在用之前 20min 内加入。

Nucleus Separation Mix:

组分	1 RXN (μ L) ×1	2 RXNs (μ L) ×2.2
Nucleus Separation Solution	985	2167
100mM DTT	10	22
RNase Inhibitor	5	11
Total	1000	2200

2. 按下表配制 15 mL PBSA (PBS + 10%BSA) , 涡旋混匀, 并瞬时离心, 冰上放置备用。

1%PBSA:

组分	1 RXN (μ L) ×1	2 RXNs (μ L) ×2.2
PBS	13500	29700
10%BSA	1500	3300
Total	15000	33000

3. 按下表提前配制 PBSA Mix, 涡旋混匀并瞬时离心。RNase Inhibitor 在用之前 20min 内加入。

PBSA Mix:

组分	1 RXN (μ L) ×1	2 RXNs (μ L) ×2.2
1%PBSA	487.5	1072.5
RNase Inhibitor	12.5	27.5
Total	500	1100

注意: 所有试剂配制好之后, 均在冰上低温保存。

4. 称取 100mg 左右重量的组织, 若组织重量超过 200mg, 则将组织切取一部分。

注意: 组织重量不应低于 50mg, 不应高于 200mg。

5. 将称重好的组织置于 1.5mL 离心管, 用 1mL 预冷的 HBSS 清洗样品表面血渍或其他杂质, 丢弃上清后, 重复一次 (清洗两次)。
6. 将组织转移至新的 1.5mL 离心管中, 加入 100 μ L 预冷的 Nucleus Separation Mix (使用前加入 RNase Inhibitor 和 DTT, 终浓度分别为 0.2U/ μ L 和 0.1mM), 将 1.5mL 管放置在冰盒上, 用医用手术剪 (常用眼科剪), 剪碎组织至糜状物。
7. 加入预冷的 900 μ L Nucleus Separation Mix (已加 RNase Inhibitor 和 DTT), 移液器吹吸混匀, 冰上静置 5min (脑/肺组织建议静置 10min), 静置期间每间隔 2min 上下颠倒混匀一次。
8. 将管中的样品经 40 μ m 滤网过滤至 50mL 离心管中, 并用 9mL 预冷的 PBSA 多次冲洗滤网。
9. 将上一步过滤后的细胞核悬液离心 5min 后 (4 $^{\circ}$ C 200rcf), 取 9mL 上清液于新的 15mL 离心管中用于后续实验, 剩余液体和沉淀暂留。
10. 装有上清的离心管, 进一步离心 5min (4 $^{\circ}$ C 500rcf), 吸取上清至新的离心管中暂留 (肉眼不易观察的沉淀为细胞核), 沉淀用 50 μ L 预冷的 PBSA mix 轻轻吹打混匀 (向 PBSA 在使用前加入 RNase Inhibitor, 终浓度为 1.4 U/ μ L)。

11. 加入 200μL DAPI 染色液，轻轻吹打混匀，冰上避光反应 2min。
12. 使用荧光显微镜观察细胞核的状态、数目和细胞核悬液中杂质的情况。
13. （选做）根据细胞核浓度及杂质占比确定是否需要进行二次过滤：加入 5mL 预冷的 PBSA，吹打混匀，用 40μm 滤网再次过滤至新的 15ml 离心管中，4℃ 500rcf 离心 5min，取上清至新的管子中暂留。
14. （选做）加入 50μL 预冷的 PBSA mix，轻轻重悬细胞核沉淀。
15. 使用荧光显微镜观察二次过滤后细胞核的状态、数目和细胞核悬液中杂质的情况。

注意：细胞核悬液至少包含 25000 细胞核，总体积大于 100μL，否则会影响整体捕获得率。

16. 细胞核提取后，需尽快进行单细胞核分选和 mRNA 捕获。

5.2 细胞核悬液稀释

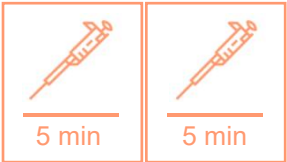
自备材料：

- PBS；
- 细胞核悬液。

1. 根据下表，将核悬浮液用预冷 PBSA Mix 稀释至 $2.5 \times 10^5 \sim 4.5 \times 10^5$ 核/mL。

NEO-chip SD:

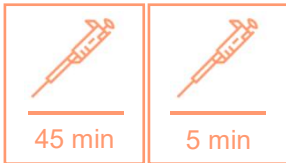
目标细胞核捕获数	推荐的细胞核悬液浓度
8000-10000	$(2.5-3.0) \times 10^5$ cells/mL
10000-13000	$(3.0-3.5) \times 10^5$ cells/mL
13000-15000	$(3.5-4.0) \times 10^5$ cells/mL



5.3 仪器操作

准备材料：

- Singleron Matrix NEO®；
- Wash Buffer A（白色）；
- Nuclei Lysis Mix（来自 4.3 步骤），
- Barcode Beads SD V3（来自 4.2 步骤）；



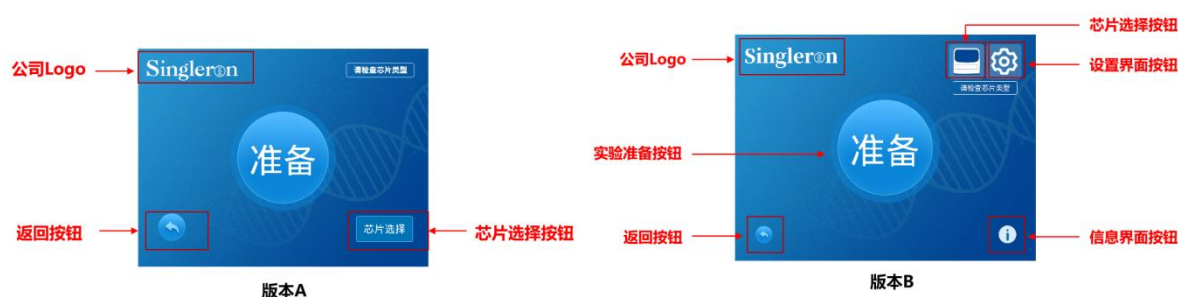
- 微流控芯片（NEO-chip SD）；
- 细胞核悬液（来自 5.2 步骤）。

自备材料：

- PBS 缓冲液；
- 不同量程单通道移液器；
- 1.5mL 离心管。

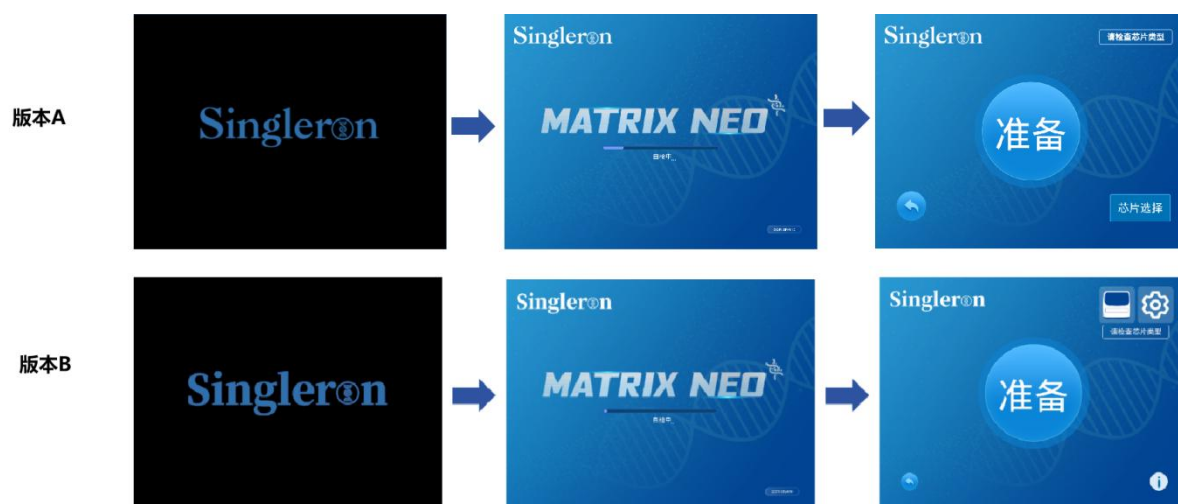
1. 准备界面介绍

本仪器提供两种界面版本：版本 A 和版本 B。两种界面在布局及部分操作方式上有所不同。以下是两种版本准备界面的具体介绍：



2. 开机自检

打开仪器电源，屏幕将显示“Singleron” Logo，随后进入自检界面，显示自检进度条及“自检中”字样。系统自检完成后，自动进入准备界面。



3. 芯片选择

本仪器支持两种芯片类型：NEO SD Chip（标准芯片）和 NEO HD Chip（高密度芯片）。

版本 A：点击屏幕右下角“芯片选择”按钮，根据需求，选择对应芯片类型，点击“保存”后出现“芯片参数保存成功”字样，再点击“返回”按钮退回准备界面。

版本 B：点击屏幕右上角显示仪器图标芯片选择项，根据需求选择对应芯片类型。全部选择完成后，点击“保存”，屏幕显示“芯片参数保存成功”，再点击“返回”按钮回到准备界面。



4. 试剂添加

点击“准备”按钮，系统将对各部件状态进行检测及复位，完成检测及复位后，“准备”字样变成“准备中”，同时载台推出，系统进入开始界面。此时，请放置芯片并依次添加相应试剂。



NEO SD Chip 加样体积:

试剂名称	体积
Beads	80 μ L
细胞核悬液	100 μ L
Lysis	150 μ L
PBST	300 μ L
Wash Buffer A	500 μ L
PBS	1400 μ L

重要提示:

1. Lysis 配置参考 “4.3 Nuclei Lysis Mix 准备”。
2. 细胞核悬液加样需在最后一步进行。

5. 实验开始

点击“开始”按钮进入实验倒计时界面，同时载台推入仪器，仪器运行时间为 39 分 30 秒。



6. 实验完成

实验完成后，系统弹出“实验已结束”对话框，点击“确认”按钮后系统回到“已完成”界面，同时载台推出，且在完成后灰色“已完成”按钮恢复亮度。



7. 完成制备与收样

使用 200 μ L 的移液枪将产物槽中的产物尽快回收至预冷的 1.5mL 离心管内，并用 200 μ L 的移液枪吸取 200 μ L Wash Buffer A 重复冲洗产物槽 2-3 次,直至产物槽内 Barcode Beads 无残留，产物回收后应置于冰上，及时进行后续实验操作，以免影响实验结果。收样结束后，点击仪器“已完成”按钮后系统回到“准备”界面，同时载台收回。

6. 反转录 cDNA 扩增

6.1 反转录

准备材料：

- Wash Buffer B;
- SN RT Master Mix (紫色);
- TS Primer (紫色);
- RNase Inhibitor (绿色);
- Reverse Transcriptase (紫色);
- 100mM DTT(绿色);
- 上一步骤捕获了 mRNA 的 Barcode Beads ;
- Wash Buffer A。



自备材料：

- Nuclease-free water;
- 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“SN RT Master Mix”和“TS primer”和“100mM DTT”，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 SN RT Master Mix 试剂溶液中有沉淀物，请用手指轻弹试剂管壁）。

RT Mix (NEO-chip SD):

组分	1 RXN (μL) × 1	2 RXNs (μL) × 2.2
SN RT Master Mix	130	286
Nuclease-free water	15	33
TS Primer	10	22
RNase Inhibitor	5	11
100mM DTT	20	44
Reverse Transcriptase	20	44
Total	200	440

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 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 200μL（SD 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℃，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）。

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；
- Nuclease-free water；
- 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℃。

热盖温度 105℃	反应体积 50μL	
步骤	温度	时间
1	95℃	3 min
2 cycles = 4	98℃	20 sec
	65℃	45 sec
	72℃	3 min
	98℃	20 sec
3 cycles = 10	67℃	20 sec
	72℃	3 min
4	72℃	5 min
5	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 (NEO-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
Nuclease-free water	188	413.6
Amplification Enzyme	8	17.6
Total	400	880

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 400 μL (SD 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 50μL。

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℃，反应体积 50μL。
6. PCR 程序运行结束后，可将扩增产物在 4℃保存 48h 和 -20℃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；
- 新鲜配制的 80%乙醇；
- 10mM Tris-HCl pH 8.5 或 Elution Buffer；
- AMPure XP 纯化磁珠；
- DynaMag™-2 磁力架/12321D/Thermo 或其他兼容 1.5mL 离心管的磁力架。



注意：

- 1) 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。
- 2) 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) 80%乙醇。将 PCR 扩增产物收集到 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 (或 2mL) 离心管中，暂留。

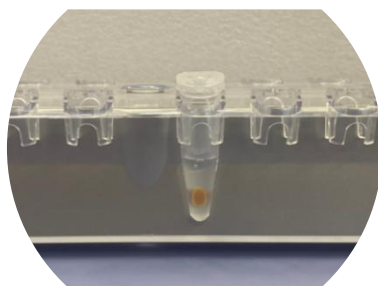


图2 AMPure Beads 在磁力架上吸附示意图

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。
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。

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. 取一份待测样品（1 μ L），用 Qubit 4.0 荧光定量仪进行浓度定量。

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

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 3)。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”）

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 3 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

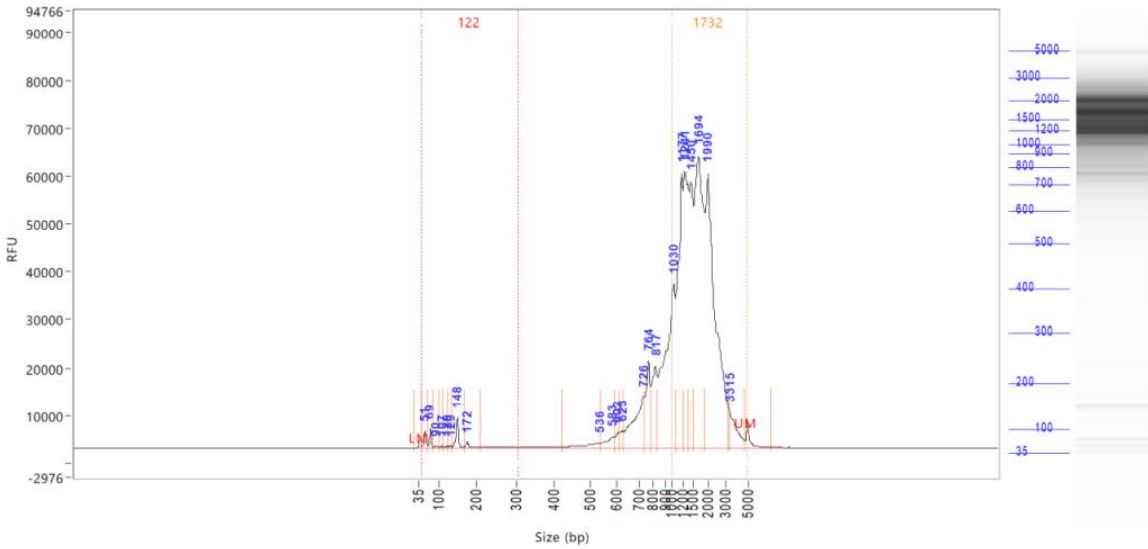


图3 cDNA 片段分布示意图

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
步骤	温度	时间
1	37 $^{\circ}$ C	10min
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）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 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 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。

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：

- Nuclease-free water；
- AMPure XP 纯化磁珠；
- 新鲜配制的 80%的乙醇；
- 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 (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%乙醇和 25 μ L 0.1 X TE 溶液（将 1 X TE 与 Nuclease-free water 以 1:10 稀释）。
2. 将产物 PCR 管短暂离心，用移液器测量体积，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 μ L，则应使用 $0.2 \times 68.5 = 13.7$ μ 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 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 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。



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 50μL。

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 7.3 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。

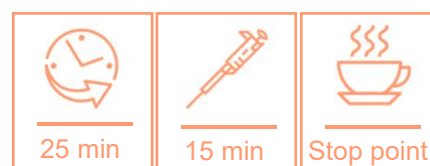
扩增循环数需按 cDNA 投入量进行选择，选择要求如下：

cDNA 投入量	参考循环数
50ng	10
10ng	12

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。

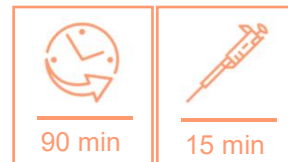
1. 每个反应准备 0.5mL 80%乙醇。
2. 将 7.4 产物 PCR 管短暂离心，用移液器测量体积，涡旋混匀磁珠，AMPure XP 纯化磁珠体积为 0.5x 产物总体积。（例如，产物体积为 50 μ L,则使用 0.5x50=25 μ L AMPure XP 纯化磁珠，涡旋振荡 15s 充分混匀，室温孵育 5min。）
注：纯化磁珠比较粘稠，需充分涡旋振荡混匀后准确移取相应的体积，否则可能导致分选的片段长度与预期不一致。
3. 将 PCR 管短暂离心后置于 0.2mL 规格磁力架（磁力架/TND08-C-A/深圳拓能达，本小节磁力架同规格）上静置，使纯化磁珠与液体分离，待溶液澄清后（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 μ 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 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。
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 μ L Elution Buffer 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 μ L 上清至新的灭菌 1.5mL 离心管中。

注意：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. 取一份待测样品（1μL）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。（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. 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

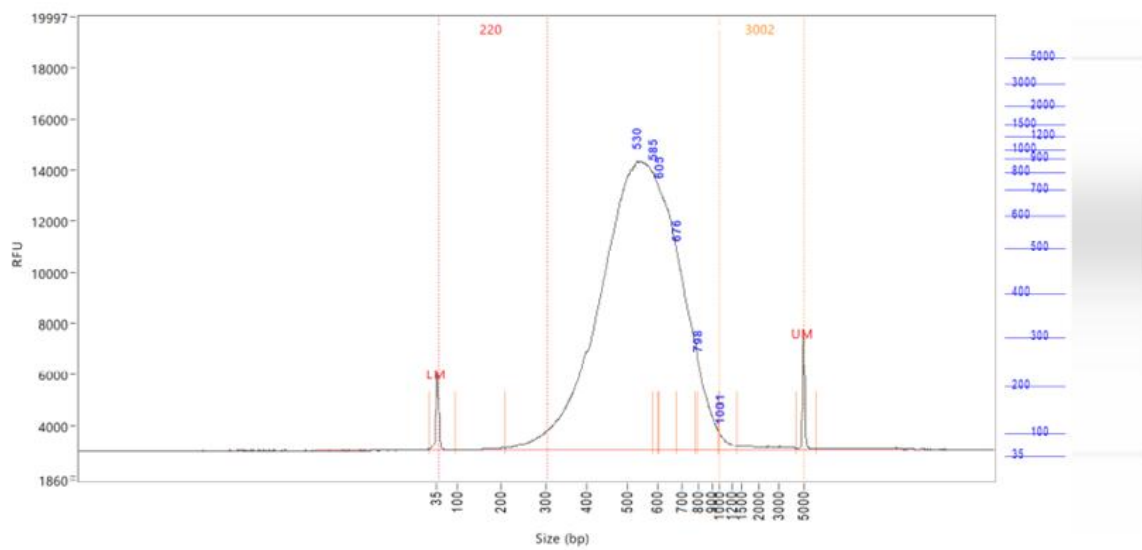


图4 文库质检图

附录 A 技术原理

单细胞核分离和 mRNA 捕获、反转录及 PCR 富集原理

利用 NEO-chip 微流控芯片捕获单细胞核,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 。

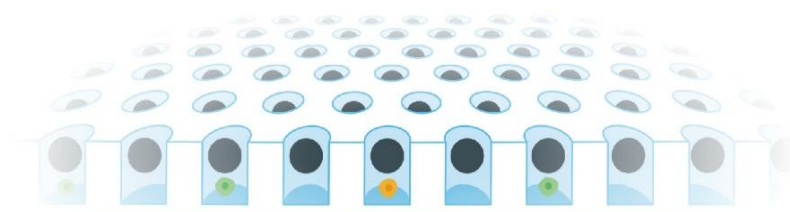
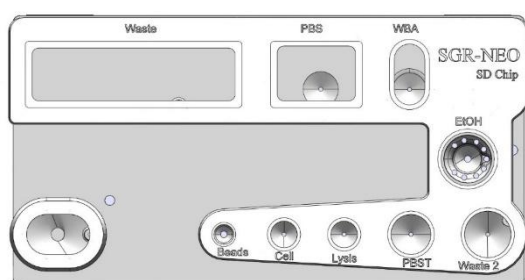


图 A1: NEO-chip®微流控芯片外形(左)及细微结构(右)

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) 用于区分单细胞核, 分子标签(UMI)用于定量 mRNA 和 PolyT 核苷酸序列用于捕获细胞核释放的 mRNA。细胞核裂解后, Barcode Beads 通过与 mRNA 上的 poly (A) 尾结合捕获 mRNA, 对细胞核及 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。

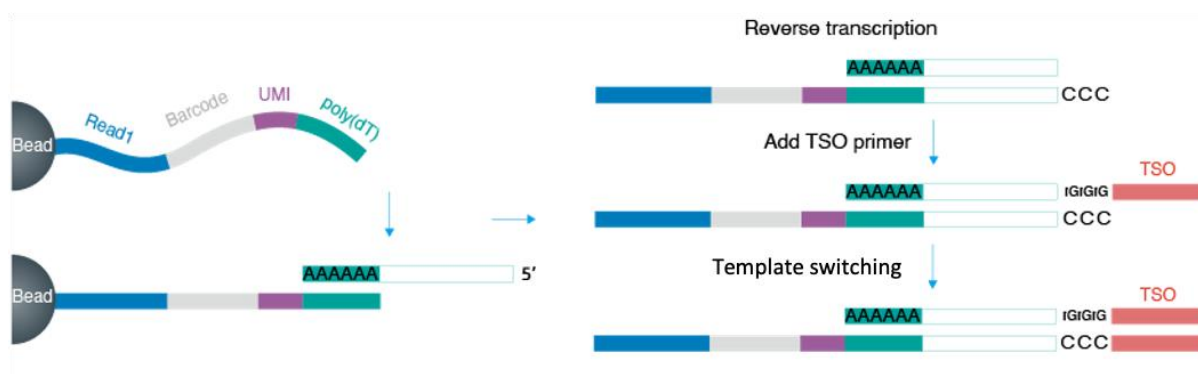


图 A2: 磁珠捕获 mRNA 及反转录原理图

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。

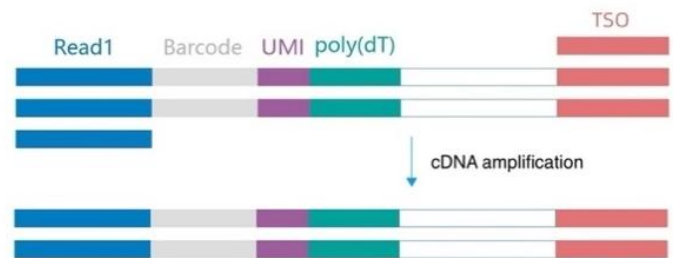


图 A3: cDNA 富集扩增原理图

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。

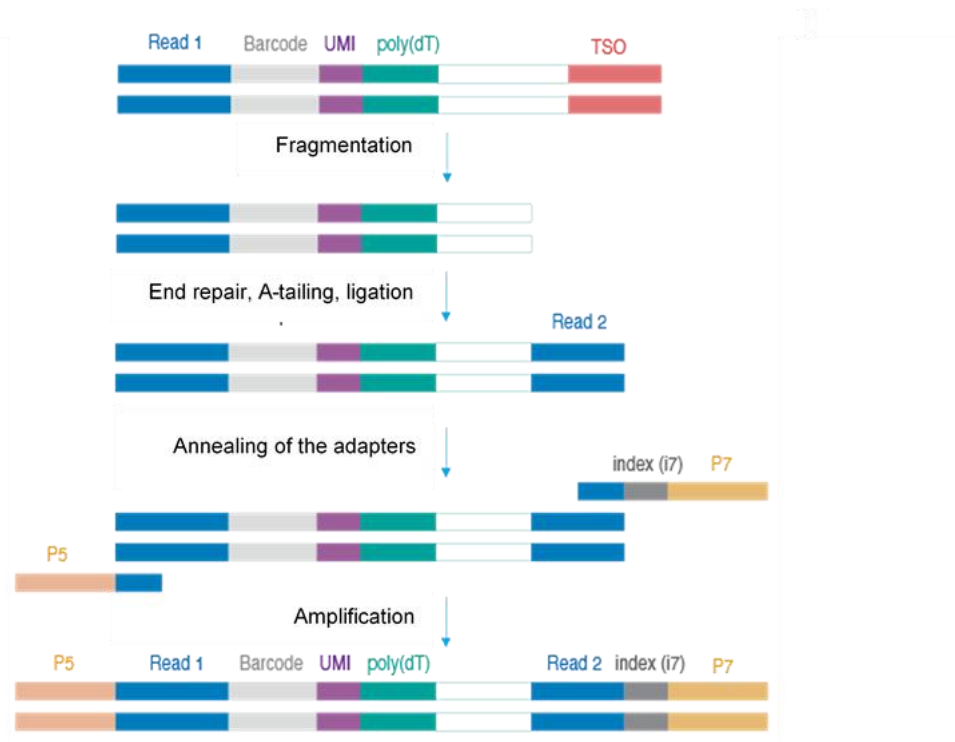


图 A4: 转录组文库构建原理图

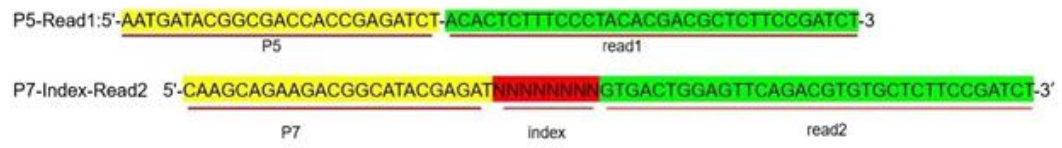


图 A5: 转录组 illumina 文库结构图 (左右两侧序列)

附录 B 测序

测序文库

GEXSCOPE®单细胞核 RNA 文库试剂盒产生标准的 Illumina 单端测序文库，以 P5 开始，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 B1: 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

每个细胞核 30,000 reads。

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。

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）