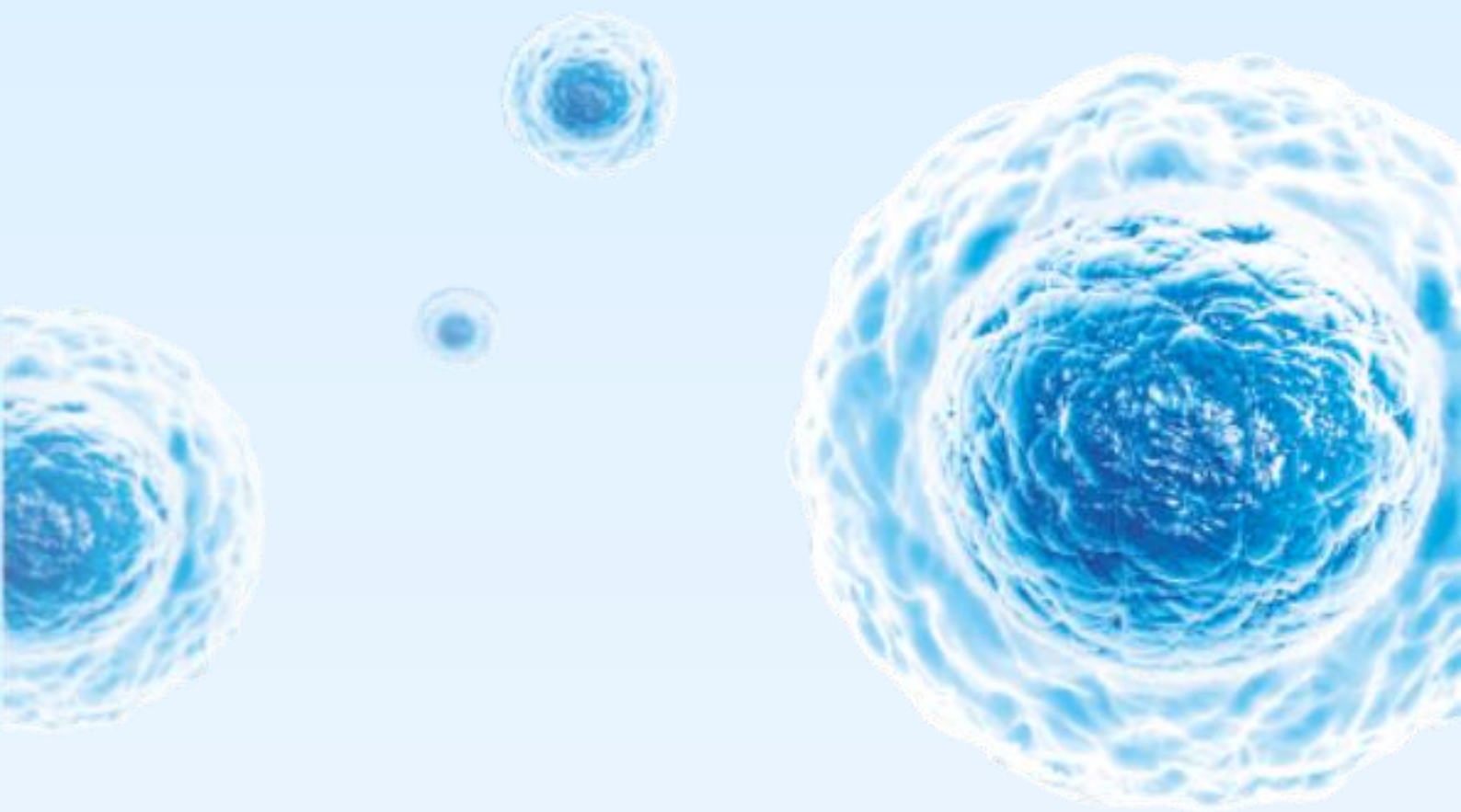




AccuraSCOPE® Single Cell Transcriptome and Genome Library Kit

中低通量单细胞转录组联合基因组测序试剂盒（96 孔）用户手册

本手册适用于以下产品：

目录号	产品名称	规格
1403364	AccuraSCOPE® Single Cell Transcriptome and Genome Library Kit	1 RXN

历史版本信息

版本信息	修改内容
1	初版
2	产品更新

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	- 1 -
2. 自备仪器耗材试剂	- 3 -
3. 工作流程和操作时间	- 5 -
4. 实验注意事项及实验准备	- 7 -
5. 单细胞分离和 mRNA 捕获	- 8 -
5.1 细胞准备	- 8 -
5.2 DR Lysis Mix 准备	- 8 -
5.3 细胞裂解和 mRNA 捕获	- 9 -
6. 反转录和 cDNA 扩增	- 12 -
6.1 反转录	- 12 -
6.2 cDNA 扩增	- 13 -
6.3 cDNA 产物纯化	- 15 -
6.4 cDNA QC	- 16 -
7. 转录组文库构建	- 18 -
7.1 片段化	- 18 -
7.2 接头连接	- 19 -
7.3 接头连接后产物纯化	- 20 -
7.4 PCR 富集	- 21 -
7.5 扩增产物片段分选	- 22 -
7.6 文库质检	- 24 -
8. gDNA 释放和 gDNA 纯化	- 26 -
8.1 gDNA 释放	- 26 -
8.2 gDNA 纯化	- 26 -
9. gDNA 扩增	- 27 -

9.1 gDNA 预扩增	- 28 -
9.2 gDNA 扩增	- 29 -
9.3 gDNA QC	- 30 -
10. 基因组文库构建	- 32 -
10.1 片段化	- 32 -
10.2 接头连接	- 33 -
10.3 接头连接后产物纯化	- 34 -
10.4 PCR 富集	- 36 -
10.5 扩增产物片段分选	- 36 -
10.6 文库质检	- 38 -
附录 A 技术原理	- 40 -
附录 B 测序	- 42 -
转录组文库测序信息	- 42 -
基因组文库测序信息	- 43 -

1. 基本信息

1.1 产品概述

AccuraSCOPE® Single Cell Transcriptome and Genome Library Kit 是一款基于 96 孔板设计的产品，可同时获得来自 96 个单细胞的全长转录组和基因组信息，提供了一种高效、准确和全面的方法。通过联合转录组和基因组数据，获得更深入的细胞特征和调控信息，有助于进行细胞类型鉴定、基因表达调控网络分析、突变检测和基因型与表型关联等研究。

AccuraSCOPE® Single Cell Transcriptome and Genome Library Kit 基于 96 孔板设计，利用带有 polyT 尾的磁珠和 ASF TS Primer 从单个细胞中分离出全长 mRNA，经过反转录和 cDNA 扩增，构建包含 96 个样本转录本的混合 RNA-seq 文库；基于等温扩增技术获得全基因组，并结合 barcode 条形码，构建包含 96 个样本基因组的混合 DNA-seq 文库。通过 barcode 条形码拆分出单个细胞的转录组和基因组信息，从而联合转录组和基因组数据，获得更全面的细胞信息。

1.2 产品组成

以下适用于

AccuraSCOPE® Single Cell Transcriptome and Genome Library Kit (96 wells)

Box 1: AccuraSCOPE® DR Lysis & Wash Buffer

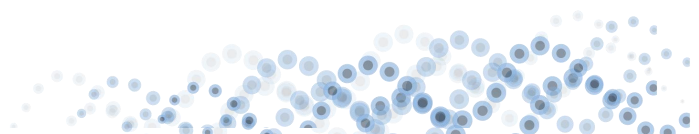
收到试剂盒后，请及时保存在 2~8℃。

组分	数量	体积	管盖颜色
Wash Buffer A	1	7 mL	白色瓶子
DR Lysis Enzyme	1	80μL	绿色

Box 2: AccuraSCOPE® DR Amplification & Library Construction 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
DR Barcode Beads	1	5μL/well	96 孔板
ASF Lysis Buffer	1	600μL	绿色
100 mM DTT	1	100μL	绿色



DR Pre-Amp Reaction Buffer	1	1.5mL	红色
DR Amp Reaction Buffer	2	1.5mL	红色
DR Amp Enzyme	1	160μL	红色
RNase Inhibitor	2	50μL	绿色
ASF Lysis Enhancer	1	100μL	绿色
Wash Buffer B	2	7mL	白色瓶子
RT master Mix	2	400μL	紫色
Reverse Transcriptase	1	70μL	紫色
RT Enhancer	1	150μL	紫色
ASF TS Primer	1	10μL/ well	96 孔板
Amplification Master Mix	2	400μL	透明
Amplification Enzyme	2	20μL	透明
ASF Amplification Primer	1	120μL	透明
Purification Beads Wash Buffer	1	1.5 mL	透明
Fragmentation Buffer V3	1	135μL	橙色
Fragmentation Enzyme Mix V3	1	40μL	橙色
1 × TE	1	800μL	橙色
Ligation Mix	1	576μL	蓝色
Ligation Booster	1	20μL	蓝色
Adaptor	1	50μL	蓝色
Barcode-ADT*	1	10μL /well	96 孔板
Library Amp Mix V3	1	60 μL	白色
Indexing Primer Mix5 (ACAGTGGT)	1	30 μL	白色
Indexing Primer Mix6 (GCCAATGT)	1	30 μL	白色

注意:

- 按照各自的保存温度存放试剂。
- DR Barcode Beads, ASF TS Primer and Barcode-ADT 分别包装在三个锡箔纸密封的 96 孔板中。

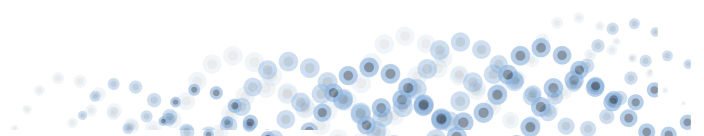
2. 自备仪器耗材试剂

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

细胞裂解和 DNA&RNA 捕获

- RNase Away 或其他同类产品
- 不同规格无菌&无核酸酶吸头
- 无菌&无核酸酶高通量 PCR 板 (96 well)
- 倒置显微镜
- 血球计数板
- 1×PBS (不含 Ca^{2+} + Mg^{2+})
- 不同量程单通道移液器和高通量移液器
- 无菌&无核酸酶移液槽
- 96 孔磁力架
- PCR 8 联管
- 四维旋转混合仪



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

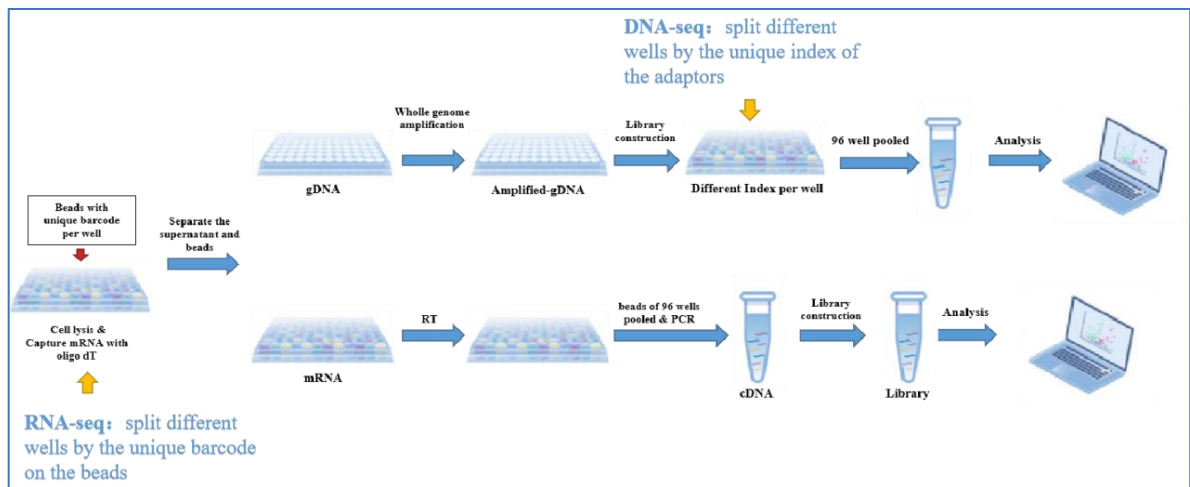


图 1 技术流程图

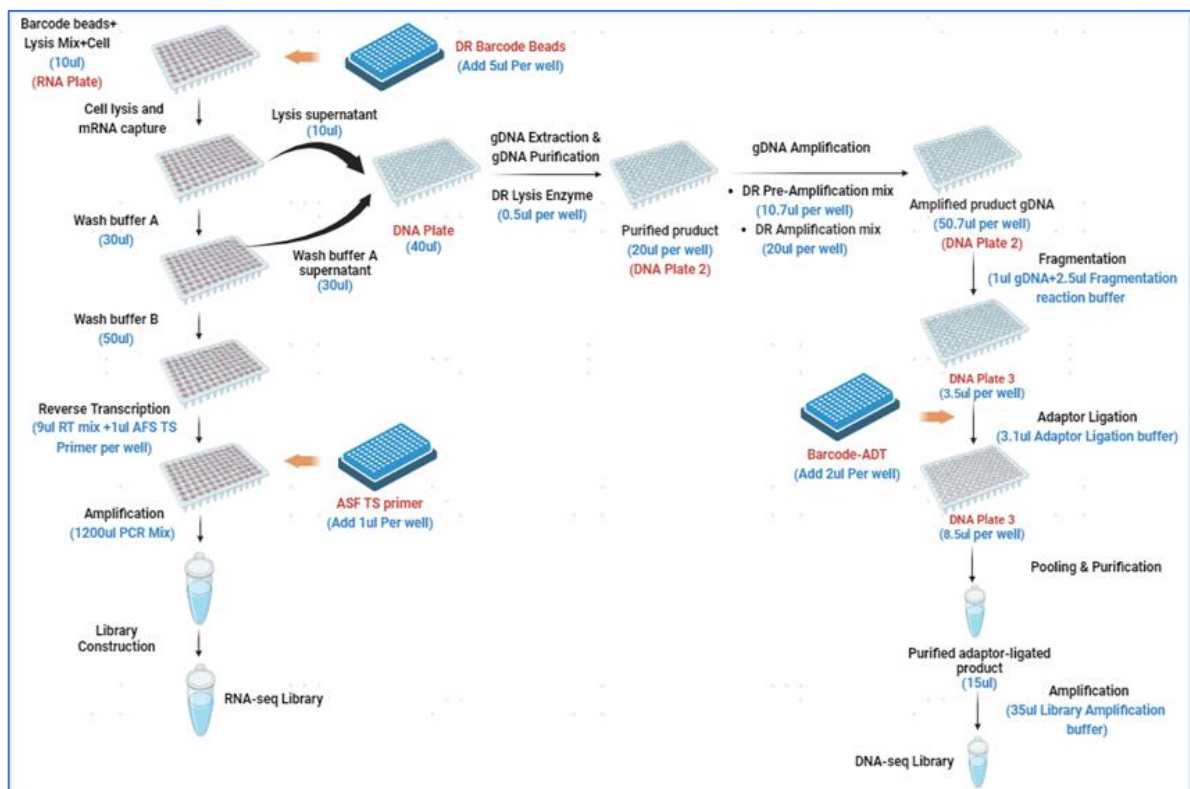


图 2 试剂盒操作流程

该工作流程分为两个主要部分，同时获得 96 个单细胞的转录组和基因组信息。

RNA:

步骤	时间	终止&保存
细胞裂解和 mRNA 捕获	30 min	
反转录	1 h 45 min	4°C 过夜
cDNA 扩增	2 h	4°C保存 48 h 或-20°C保存一周
转录组文库构建	2.5 h	-20°C或-80°C 保存 3 个月
Total	7 h	

gDNA:

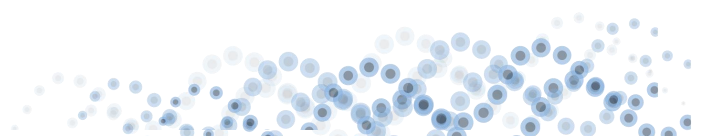
步骤	时间	终止&保存
gDNA 释放	40 min	4°C保存 2 h 或-20°C保存 24 h
gDNA 纯化	1 h	-80°C保存 3 天
gDNA 预扩增	1.5 h	-20°C保存 3 天
gDNA 扩增	2 h	-20°C保存 7 天
基因组文库构建	2.5 h	-20°C或-80°C保存 3 个月
Total	7-8 h	

4. 实验注意事项及实验准备

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。

为取得更好的结果，应即时准备和使用试剂，避免多次冻融。



5. 单细胞分离和 mRNA 捕获

5.1 细胞准备

准备材料:

- 细胞悬液
1. 细胞活性 $\geq 85\%$ 。
 2. 可用 1 X PBS 或细胞培养基重悬细胞。

5.2 DR Lysis Mix 准备

准备材料:

- ASF Lysis Buffer (绿色)
- ASF Lysis Enhancer (绿色)
- 100 mM DTT (绿色)
- RNase Inhibitor (绿色)
- DR Barcode Beads (Plate)



自备材料:

- 10 μ L 移液器吸头
 - 无菌&无核酸酶高通量 PCR 板 (96 well)
 - PCR 8 联管
1. 室温解冻“ASF Lysis Buffer”、“100mM DTT”和“DR Barcode Beads”，涡旋离心然后置于冰上。
 2. 将 DR Barcode Beads 96 孔板分离，用移液器每孔转移 5 μ L 到一个新的 96 孔板中，此板命名为 RNA 板。

注意：加 DR Barcode Beads 时，用移液器直接扎进相应孔锡箔纸，吸取前要反复吹吸混匀磁珠后再转移到新的 96 孔板。

3. 在冰上按下表格配制 DR Lysis Mix，涡旋混匀并短暂离心，置于冰上备用。

DR Lysis Mix:

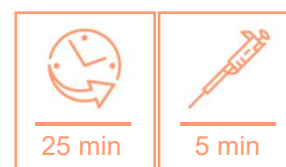
组分	1 well (1 x RXN, μL)	96 wells (1.2 x RXN, μL)
ASF Lysis Buffer	3.75	432
100mM DTT	0.5	57.6
ASF Lysis Enhancer	0.5	57.6
RNase Inhibitor	0.25	28.8
Total	5	576

4. 向 RNA 板中加入配制好的 Lysis Mix，每孔 $5\mu\text{L}$ 。封膜密封后，涡旋混匀 10s，短暂离心，在冰上暂存。

5.3 细胞裂解和 mRNA 捕获

准备材料:

- Wash Buffer A (白色瓶子)
- Wash Buffer B (白色瓶子)
- 步骤 5.2 的 RNA 板



自备材料:

- 无菌&无核酸酶高通量 PCR 板 (96 wells)
- 96 孔板封膜
- 96 孔板磁力架
- 四维旋转混合仪

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. 使用流式细胞术、荧光活化细胞分选(FACS)或其他单细胞分离方法辅助单个细胞分离，将单个细胞分离到 96 孔板中，每孔加入的单个细胞体积为 $2\mu\text{L}$ 或更少。将 96 孔板用封膜密封好，涡旋混匀 10s，短暂离心。

注意：细胞不要加到管壁上。

2. 将 RNA 板置于四维旋转混合仪上，室温下旋转 15min，转速 20–30rpm。

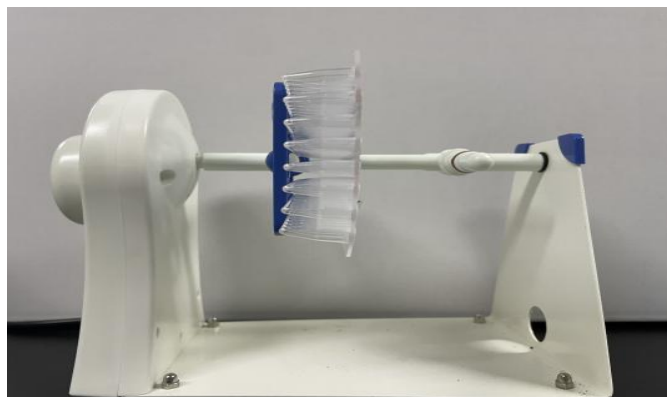


图 3 用于细胞裂解和 RNA 捕获的四维旋转混合仪

3. 孵育结束后，将 RNA 板短暂离心，并放在 96 孔磁力架上，直到溶液澄清。
4. RNA 板始终保持放置于磁力架上，将上清液小心转移到一个新的 96 孔板中，注意上清液每孔的位置要和 RNA 板一致，上清液中包含了将用于后续 DNA 文库制备的基因组 DNA（新的 96 孔板被称为 DNA 板）。随后立即向 RNA 板中每孔加入 30 μ L Wash Buffer A，使用封膜密封，涡旋混匀后短暂离心。

注意：

- 1) 后续操作过程保持磁力架置于冰上，防止 mRNA 降解。
- 2) DR Barcode Beads 易干燥，在转移每一行（列）中的上清液后，需立即向本行（列）中加入 Wash Buffer A。
- 3) 为了能够同时分析同一细胞的基因组和转录组，DNA 板的布局和孔的顺序必须与 RNA 板相一致。

RNA Plate (96well)												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
B	13	14	15	16	17	18	29	20	21	22	23	24
C	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36
D	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48
E	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
F	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72
G	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84
H	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96

→

DNA Plate (96well)												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
B	13	14	15	16	17	18	29	20	21	22	23	24
C	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36
D	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48
E	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
F	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72
G	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84
H	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96

图 4 RNA 板和 DNA 板

5. 将 RNA 板放在 96 孔磁力架上，溶液澄清后，将上清液小心转移到第 4 步中的 DNA 板中，注意枪头不要碰到磁珠，并保持上清液每孔的位置和 RNA 板一致。随后立即向 RNA 板每孔中加入 50 μ L Wash Buffer B，使用封膜密封，涡旋混匀短暂离心后放置在冰上暂存。若不能立即进行 DNA 部分

的实验，可将 DNA 板放置 4℃冰箱待用；若不能在 1h 内进行 DNA 部分实验，建议放置-20℃保存。

注意：

- 1) DR Barcode Beads 易干燥，在转移每一行（列）中的上清液后，需立即向本行（列）中加入 Wash Buffer B。
- 2) 为了能够同时分析同一细胞的基因组和转录组，DNA 板的布局和孔的顺序必须与 RNA 板相一致。
- 3) 如不能立即进行后续 DNA 扩增，用封口膜密 DNA 板，在 4℃保存 2 小时或-20℃保存 24 小时。

6. 反转录和 cDNA 扩增

6.1 反转录

准备材料：

- RT master Mix (紫色)
- ASF TS Primer (96 孔板)
- RNase Inhibitor (绿色)
- RT Enhancer (紫色)
- Reverse Transcriptase (紫色)
- 步骤 5.3 的 RNA 板



自备材料：

- 无核酸酶水
 - 96 孔板磁力架
 - 96 孔板封膜
1. 体系配制：室温解冻 RT master Mix 和 ASF TS primer，涡旋混匀并短暂离心，置于冰上暂存。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 well (1 x RXN, μ L)	96 wells (1.2 x RXN, μ L)
RT master Mix	6	691.2
Reverse Transcriptase	0.5	57.6
RNase Inhibitor	0.25	28.8
Nuclease-free Water	1.75	201.6
RT Enhancer	0.5	57.6
Total	9	1036.8

2. 将配置好的 RT Mix 分到 8 联管中，每孔 125 μ L。
3. 将 RNA 板放置在 96 孔磁力架上，待溶液澄清后小心去除上清，随后立即向 RNA 板每孔中加入 9 μ L

RT Mix。

注意：DR Barcode Beads 易干燥，在去除每一行（列）中的上清液后，需立即向本行（列）中加入 RT Mix。

4. 使用封口膜密封，涡旋混匀，使 95%以上磁珠处于完全离散状态后短暂离心，置于冰上。
5. 在冰上向 **RNA 板** 每孔中加入 1 μ L ASF TS Primer，同时用移液器缓慢吹吸混匀，记录好每孔使用的 ASF TS Primer 编号，使用封口膜密封 **RNA 板**，置于冰上待用。

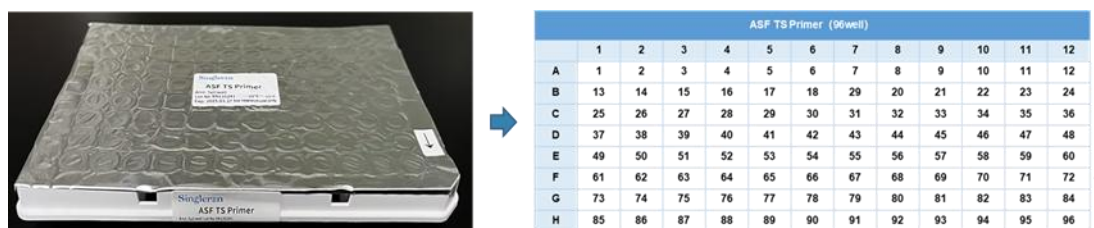


图 5 ASF TS Primer 板分布图

建议：加入 ASF TS Primer 的顺序与 RNA 板相一致。

6. 将 **RNA 板** 放入 PCR 仪中，进行以下程序：

热盖温度 80℃		反应体积 10 μ L	
步骤	温度	时间	
1	42℃	1 h 30 min	
2	70℃	15 min	
3	4℃	Hold	

6.2 cDNA 扩增

准备材料：

- Amplification Master Mix (透明)
- ASF Amplification Primer (透明)
- Amplification Enzyme (透明)
- 步骤 6.1 的 RNA 板



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℃。

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 = 19	67℃	20 sec	
	72℃	3 min	
4	72℃	5 min	
5	4℃	Hold	

2. 室温解冻 Amplification Master Mix 和 ASF Amplification Primer，涡旋混匀并短暂离心，置于冰上暂存。按照下表在冰上配置 PCR Mix，涡旋混匀并短暂离心，置于冰上暂存。

PCR Mix:

组分	1 x RXN (μL)	1.2 x RXN (μL)
Amplification Master Mix	516	619.2
ASF Amplification Primer	19.2	23.04
Cold nuclease-free water	640.8	768.96
Amplification Enzyme	24	28.8
Total	1200	1440

3. 短暂离心 **RNA 板**，将每孔中的液体和磁珠吹打混匀，并转移合并所有的产物到一个 2mL 离心管中。
4. 将装有 RT 产物的 2mL 离心管放置于磁力架上，待溶液澄清后（约 5min）小心去除上清。
5. 将 2mL 离心管从磁力架上取出，置于冰上并向离心管中加入 1200μL PCR Mix。
6. 涡旋混匀并短暂离心 2mL 离心管，将内容物分装至 3 个 8 联管中，每孔体积为 50μL。
7. 将 8 联管放入 PCR 仪中，设置热盖温度 105℃，反应体积 50μL。

8. 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
- 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 (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 600 μ L, 则加入 $0.6 \times 600 = 360 \mu$ 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。

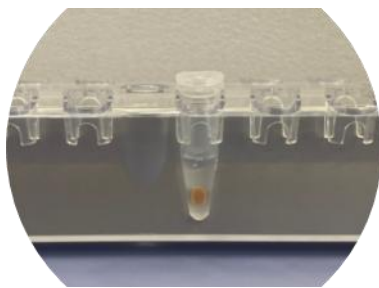


图 6 AMPure Beads 在磁力架上吸附示意图

3. 将离心管从磁力架上取出，每管分别加入 400 μ L Purification Beads Wash Buffer，涡旋 15s，在室温下孵育 5min。
4. 将离心管短暂离心，放在磁力架上 5 分钟，直到液体澄清，小心吸除上清液。
5. 保持离心管始终处于磁力架上，每管加入 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。
6. 重复步骤 5，共计漂洗 2 次。
7. 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）。
8. 取下离心管，每管加入 15 μ L Buffer EB 洗脱。涡旋振荡 15s 混匀纯化磁珠，室温孵育 5min。
9. 将离心管短暂离心并置于磁力架上，使磁珠与液体分离，待溶液澄清后（约 5min）小心吸取两管的上清合并至一个新的灭菌 1.5mL 离心管中，-20 $^{\circ}$ C或-80 $^{\circ}$ C可以保存三个月。

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。
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%。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

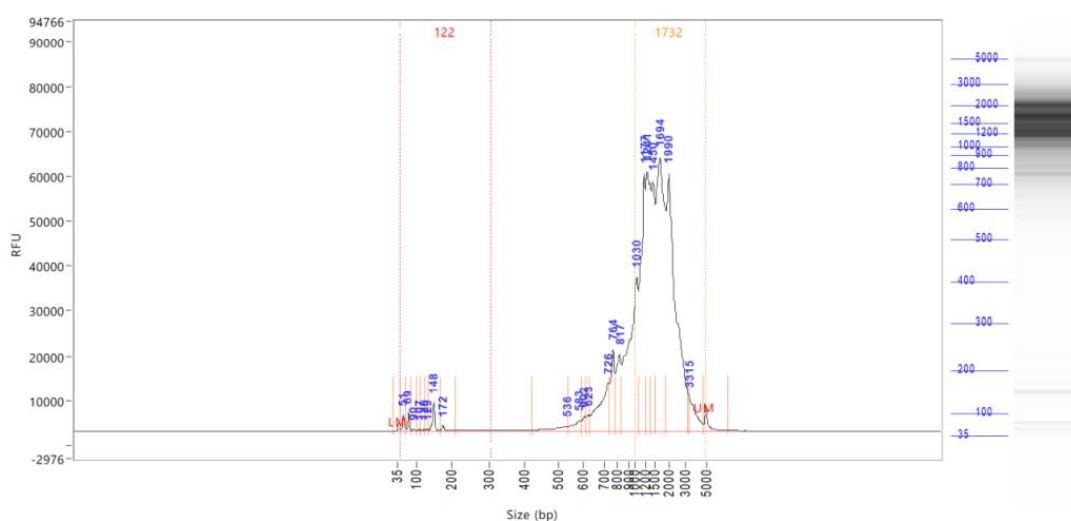


图 7 cDNA 片段分布示意图

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 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 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

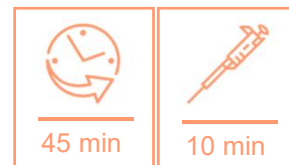


7. 转录组文库构建

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 35μL，并使 PCR 仪热盖保持在 75℃。

热盖温度：75° C		反应体积：35μL
Step	Temperature	Time
1	37° C	10 min
2	65° C	30 min
3	4° 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)
cDNA (10ng 或 50ng)	Variable
1 X TE	Variable
Fragmentation Buffer V3	7
Fragmentation Enzyme Mix V3	2
Total	35

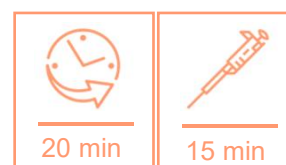
6. 用移液器轻柔吹打充分混匀，瞬时离心后将 PCR 管置于预热的 PCR 仪中并运行片段化程序。

7. 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



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° 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 (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：

- 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 (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，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。）
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 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 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 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。

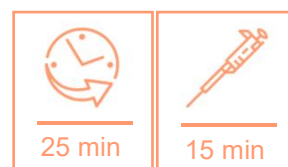
注意：此步骤结束后可以将样品于 4℃保存 72 小时，-20℃保存一周。

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 50 μ L。



热盖温度: 105° C		反应体积: 50 μ L
步骤	温度	时间
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

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	13

- 室温解冻 Indexing Primer Mix, 涡旋混匀后冰上备用。使用前将 Library Amp Mix V3 涡旋混匀, 短暂离心后置于冰上备用。
- 将 PCR 管置于冰上, 配置如下反应体系, 并使用移液器轻柔吹打混匀并短暂离心, 将反应管置于 PCR 仪中。

组分	体积 (μ L)
Purified adaptor-ligated product	15
Library Amp Mix V3	25
Indexing Primer Mix*	10
Total	50

* 每个反应选择一种 Indexing Primer Mix。

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;

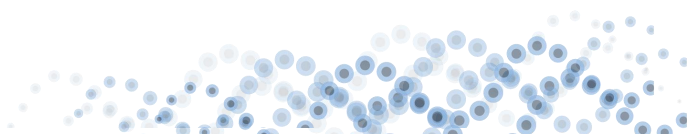


- AMPure XP 纯化磁珠；
- 新鲜配制的 80%乙醇；
- 不同量程单通道移液器；
- 无核酸酶 PCR 管；
- 1.5mL 离心管；
- 磁力架/TND08-C-A/深圳拓能达或 DynaMag™-PCR 磁力架/492025/Invitrogen。

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，不足 50μL，用水补足至 50μL，加入 25μL AMPure XP 纯化磁珠，涡旋振荡 15s 充分混匀，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 7.5μL 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 200μL 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 20μL Buffer EB 洗脱。涡旋振荡 15s 混匀纯化磁珠，室温孵育 5min。



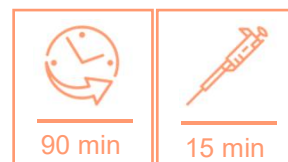
10. 将 PCR 管短暂离心并置于磁力架上，使纯化磁珠与液体分离，待溶液澄清后（约 5min）小心吸取 18 μ L 上清至新的灭菌 1.5mL 离心管中。

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
- 取一份待测样品（1 μ L）用 Qubit 4 荧光计测定浓度。
 - 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）。
 - 理想的文库应符合以下标准：
 - 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。
 - 900 bp 至 1500 bp 之间的片段占比小于 10% 。
 - 300 bp 以下的片段占比小于 10% 。
 - 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

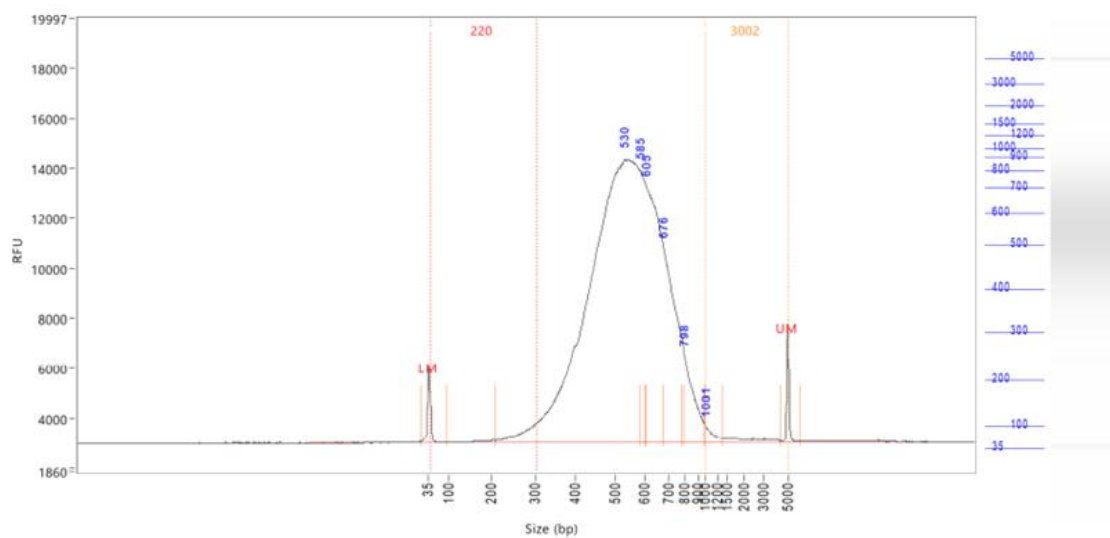


图 8 文库质检图

8. gDNA 释放和 gDNA 纯化

8.1 gDNA 释放

准备材料：

- 步骤 5.3 的 DNA 板
- DR Lysis Enzyme (绿色)



自备材料：

- 无核酸酶水
- 96 孔板磁力架
- 96 孔板封膜

1. 提前取出 DR Lysis Enzyme，涡旋混匀，并短暂离心。
2. 向 DNA 板每孔中加入 0.5μL DR Lysis Enzyme，使用封口膜密封，涡旋混匀 DNA 板并短暂离心。
3. 将 DNA 板放置在 PCR 仪中，并运行以下程序：

热盖温度 95℃		反应体积 40μL	
步骤	温度	时间	
1	56℃	20 min	
2	80℃	10 min	
3	4℃	Hold	

注意：若无法立即进行下一步，将产物 80℃ 灭活 10min 后，可-20℃ 放置 24h。

8.2 gDNA 纯化

准备材料：

- 步骤 8.1 的 DNA 板



自备材料：

- 无水乙醇

- 无核酸酶水
- AMPure XP 纯化磁珠
- 96 孔板磁力架
- 96 孔板封膜

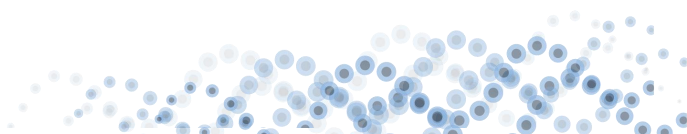
注意：

- 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 45mL 80%乙醇。
2. 将 **DNA 板** 从 PCR 仪中取出，向 **DNA 板** 每孔中加入 45μL 纯化磁珠，并用封膜密封。涡旋混匀 **DNA 板**，室温放置 5min。
3. 将 **DNA 板** 短暂离心并放置在 96 孔磁力架上，使纯化磁珠与液体分离，待溶液澄清后，小心移除上清。
4. 保持 **DNA 板** 在 96 孔磁力架上，用 200μL 新鲜配置的 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 **DNA 板**，用封膜密封，短暂离心，再次置于磁力架上，吸去多余酒精，晾干磁珠约 2min（不要超过 5min，防止磁珠干燥）。
7. 将 **DNA 板** 从磁力架上取下，加入 20 μL Nuclease-free Water，使用封口膜密封。涡旋震荡 15s 混匀磁珠，室温孵育 5min。
8. 将 **DNA 板** 短暂离心后置于 96 孔磁力架上，使磁珠与液体分离，待溶液澄清后（约 5min），将上清小心转移到一个新的 96 孔板中（该板称为 **DNA 板 2**）。

注意：此步骤结束后可以将样品于-80℃保存 72 小时。

9. gDNA 扩增



9.1 gDNA 预扩增

准备材料：

- DR Pre-Amp Reaction Buffer (红色)
- DR Amp Enzyme (红色)
- 步骤 8.2 的 DNA 板 2



自备材料：

- 96 孔板封膜
- 体系配制：室温解冻 DR Pre-Amp Reaction Buffer，涡旋混匀并短暂离心后置于冰上备用，并按照下表提前配制 Pre-Amplification Mix。

Pre-Amplification Mix:

组分	1 well (1 x RXN, μL)	96 wells (1.2 x RXN, μL)
DR Pre-Amp Reaction Buffer	10.2	1175.04
DR Amp Enzyme	0.5	57.6
Total	10.7	1232.64

- 将配置好的 Pre-Amplification Mix 分到 8 联管中，每孔 145 μL 。
- 保持 DNA 板 2 置于冰上，向 DNA 板 2 中每孔加入 10.7 μL 已经配制好的 Pre-Amplification mix，使用封口膜密封，涡旋混匀后短暂离心并置于冰上。
- 将 DNA 板 2 放置在 PCR 仪中，并运行以下 PCR 程序：

热盖温度 105°C		反应体积 35 μL	
步骤	温度	时间	
1	95°C	3 min	
	10°C	45 sec	
	20°C	45 sec	
	30°C	45 sec	
2	40°C	45 sec	
	50°C	45 sec	
	cycles = 8		

	65°C	4 min
	94°C	20 sec
	58°C	20 sec
3	4°C	Hold

5. PCR 程序运行结束后, 可将扩增产物在-20 °C保存 72h, 或者直接进行 gDNA 扩增。

9.2 gDNA 扩增

准备材料:

- DR Amp Reaction Buffer (红色)
- DR Amp Enzyme (红色)
- 步骤 9.1 的 DNA 板 2



自备材料:

- 0.2mL 无菌&无核酸酶八联排管
- 无核酸酶水
- 96 孔板封膜

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

热盖温度 105°C		反应体积 55μL	
步骤	温度	时间	
1	95°C	3 min	
2 cycles = 18	95°C	20 sec	
	58°C	30 sec	
	72°C	5 min	
	72°C	5 min	
4	4°C	Hold	

2. DR Amp Reaction Buffer 放置室温解冻, 涡旋混匀并短暂离心后置于冰上备用, 按照下表提前配制 DR Amplification Mix。

DR Amplification Mix:

组分	1 well (1 x RXN, μL)	96 wells (1.2 x RXN, μL)
DR Amp Reaction Buffer	19.5	2246.4
DR Amp Enzyme	0.5	57.6
Total	20	2304

- 将配置好的 DR Amplification Mix 分到 8 联管中，每孔 260 μL 。
- 保持 DNA 板 2 置于冰上，向 DNA 板 2 中每孔加入 20 μL 已经配制好的 DNA Amplification mix，使用封口膜密封，涡旋混匀后短暂离心，置于 PCR 仪中进行扩增，设置热盖温度 105 $^{\circ}\text{C}$ ，反应体积 55 μL 。
- PCR 程序运行结束后，可将扩增产物在 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存一周。

9.3 gDNA QC

准备材料:

- 步骤 9.2 的 DNA 板 2



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

- 取 1 μL gDNA 产物，用 Qubit 4.0 荧光定量仪进行浓度定量。

注意: 可随机取 10–20 个孔测量 gDNA 浓度。

- 取约 5ng gDNA，用 Agilent Fragment Analyzer 5200 进行片段分布分析。
- 合格的 gDNA 应满足以下条件：主峰的大小应在 800~1500bp 之间。gDNA 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 > 750ng, 质检主峰 800~1500bp 之间	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 < 750 ng, 质检主峰 < 800bp 或主峰不明显	不建议进行建库实验

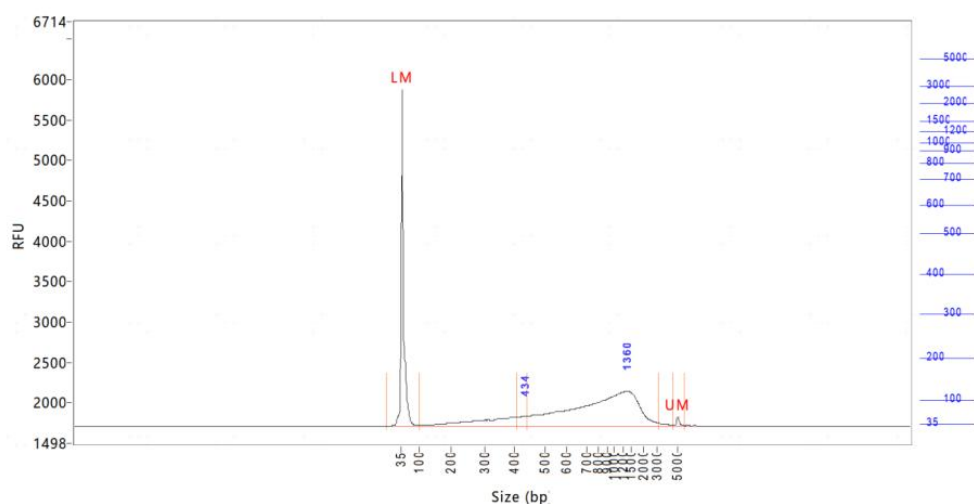


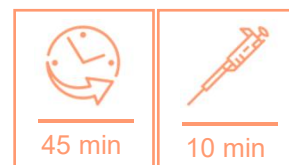
图 9 gDNA 片段分布示意图

10. 基因组文库构建

10.1 片段化

准备材料：

- Fragmentation Buffer V3 (橙色) ；
- Fragmentation Enzyme Mix V3 (橙色) ；
- 1×TE (橙色) ；
- 步骤 9.3 的 QC 合格的 gDNA 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 3.5μL，并使 PCR 仪热盖保持在 75℃。

热盖温度：75° C		反应体积：10μL
步骤	温度	时间
1	37°C	10 min
2	65°C	30 min
3	4°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. 将 PCR 管置于冰上，配制 Fragmentation reaction Mix：

Fragmentation reaction Mix：

组分	1 well (1 RXN, μL)	96 well (1.2x RXN, μL)
1 X TE	1.6	184.4
Fragmentation Buffer V3	0.7	80.6
Fragmentation Enzyme Mix V3	0.2	23
Total	2.5	288

5. 取一个新的 96 孔板置于冰上，将配制好的 Fragmentation reaction Mix 分装至新的 96 孔板中，每孔 2.5 μ L。（该板称为 **DNA 板 3**）
6. 继续保持 **DNA 板 3** 置于冰上，从 **DNA 板 2** 中每孔取 1 μ L gDNA 产物至 **DNA 板 3** 中，用封口膜密封，涡旋混匀并短暂离心。

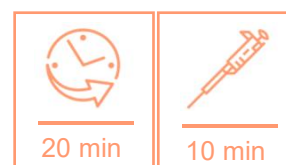
注意：取 gDNA 产物前，需先将 **DNA 板 2** 涡旋混匀；**DNA 板 2** 和 **DNA 板 3** 孔间的顺序要一一对应。

7. 将 **DNA 板 3** 置于 PCR 仪中，运行 PCR 程序，完成反应后立即进行下一步接头连接

10.2 接头连接

准备材料：

- Ligation Mix（蓝色）；
- Ligation Booster（蓝色）；
- Barcode-ADT（96 孔板）；
- 步骤 10.1 的 **DNA 板 3**。



1. 提前按照下表设置接头连接 PCR 程序，反应体系 10 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：10 μ L
步骤	温度	时间
1	20 $^{\circ}$ C	15 min
2	65 $^{\circ}$ C	10 min
3	4 $^{\circ}$ C	Hold

2. 室温解冻 Barcode-ADT，涡旋混匀并短暂离心后冰上备用。使用前将 Ligation Mix 涡旋混匀，短暂离心后置于冰上备用。
3. Ligation Mix 较粘稠，吸取时注意量取准确体积。
4. 按照下表提前配置好 Adaptor Ligation buffer，涡旋混匀，短暂离心后置于冰上备用：

Adaptor Ligation buffer:

组分	1 well (1 RXN, μL)	96 well (1.2x RXN, μL)
Ligation Mix**	3	345.6
Ligation booster	0.1	11.52
Total	3.1	357.12

**Ligation Mix 比较粘稠，小心移液确保体积准确。

- 保持 DNA 板 3 置于冰上，每孔加入 3.1 μL Adaptor Ligation buffer。
- 保持 DNA 板 3 置于冰上，添加 Barcode-ADT 至 DNA 板 3 中，每孔加入 2 μL ，记录每孔加入的 Barcode-ADT 编号。

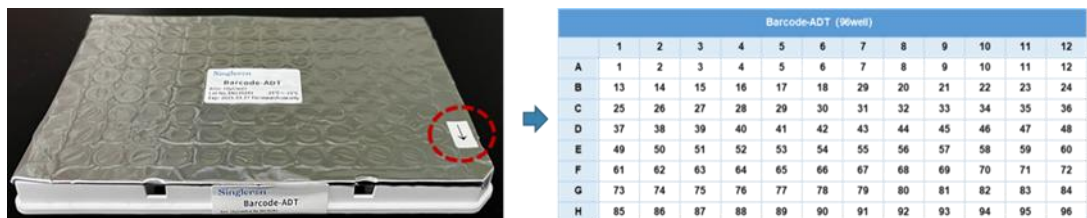


图 10 Barcode-ADT 板分布图

注意：有 96 种 Barcode-ADT，每孔需要添加不同的 Barcode-ADT。

- 使用封膜密封 DNA 板 3，涡旋混匀短暂离心后，将 DNA 板 3 置于 PCR 仪中，运行 PCR 程序。

10.3 接头连接后产物纯化

准备材料：

- 0.1 $\times$ TE (使用 Nuclease-free Water 按 1:9 稀释 1 $\times$ TE) (橙色)；
- 步骤 10.2 的 DNA 板 3

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；

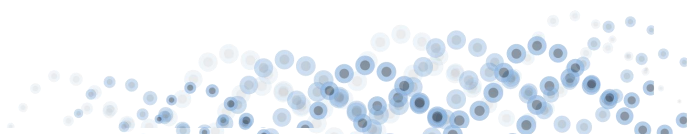


- 无核酸酶 PCR 管；
- 磁力架/TND08-C-A/深圳拓能达 或 DynaMag™-PCR 磁力架/492025/Invitrogen

注意：

- AMPure XP 纯化磁珠（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. 准备 2mL 新鲜配置的 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 DNA 板 3 短暂离心，收集每孔的产物至一个新的 1.5mL 无菌离心管中，短暂离心后使用移液器量取产物的体积。
3. 涡旋混匀纯化磁珠并加入至片段化产物中（ $0.3 \times$ 产物体积），例如，如果测量产品的体积为 200μL，则使用 $0.3 \times 200 = 60\mu\text{L}$ 的磁珠。涡旋混匀后室温孵育 5min。
4. 将离心管短暂离心后置于 1.5mL 规格磁力架上，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菌离心管中，暂时留存。
5. 将纯化磁珠所在离心管取下，加入 400μL Purification Beads Wash Buffer，涡旋振荡充分混匀，室温孵育 5min。
6. 将离心管短暂离心后置于 1.5mL 规格磁力架上，使纯化磁珠与液体分离，待溶液澄清后（约 5min），小心移除上清。
7. 保持离心管置于磁力架上，用 800μL 新鲜配制的 80%乙醇漂洗纯化磁珠，室温孵育 30s，小心吸除上清液。
8. 重复步骤 7，总计漂洗 2 次。
9. 从磁力架上取下离心管，短暂离心，再次置于磁力架上，吸去多余酒精，开盖晾干磁珠 2min（不要超过 5min）。
10. 将离心管从磁力架上取下，加入 17μL 0.1 X TE，涡旋振荡 15s 混匀磁珠，室温孵育 5min。
11. 将离心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 15μL 上清至新的灭菌 PCR 管中用于步骤 10.4 PCR 富集。

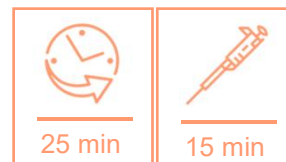


注意：此步骤结束后可以将样品于 4℃ 保存 72 小时，-20℃ 保存一周。

10.4 PCR 富集

准备材料：

- Library Amp Mix V3（白色）；
- Indexing Primer Mix（白色）；
- 步骤 10.3 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° C		反应体积：50 μL
Step	Temperature	Time
1	98° C	30 sec
2	98° C	10 sec
cycle=7	65° C	75 sec
3	65° C	5 min
4	4° C	Hold

2. 室温解冻 Indexing Primer Mix，涡旋混匀后冰上备用。使用前将 Library Amp Mix V3 涡旋混匀，短暂离心后置于冰上备用。
3. 将 PCR 管置于冰上，配置如下反应体系，并使用移液器轻柔吹打混匀并短暂离心，将反应管置于 PCR 仪中。

组分	体积（μL）
Purified adaptor-ligated product	15
Library Amp Mix V3	25
Indexing Primer Mix*	10
Total	50

* 每个反应选择一种 Indexing Primer Mix。

10.5 扩增产物片段分选

准备材料：



○ 步骤 10.4 的 PCR 富集产物

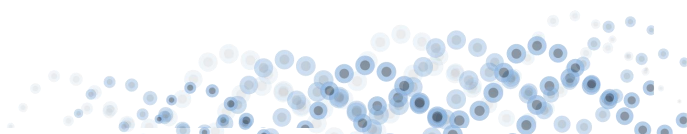
自备材料:

- 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;
- 0.2mL 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（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 1mL 80%乙醇。
2. 使用移液器吸取一半产物至一个新的 0.2mL PCR 管中，剩余产物可-20℃保存。
3. 用 Nuclease-free Water 将纯化的产物补充至 50μL，涡旋混匀纯化磁珠，吸取 25μL（0.5 × 产物体积）加入 PCR 管中，涡旋振荡充分混匀，室温孵育 5min。
4. 将 PCR 管短暂离心后置于 0.2mL 规格磁力架上静置，使纯化磁珠与液体分离，待溶液澄清后（约 5min），小心转移上清至新的无菌 PCR 管中，丢弃纯化磁珠。
5. 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。
6. 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。
7. 保持 PCR 管始终处于磁力架上，加入 200μL 新鲜配制的 80%乙醇漂洗纯化磁珠。室温孵育 30s，小心吸除上清液。



8. 重复步骤 7，总计漂洗 2 次。
9. 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，开盖晾干纯化磁珠 1min（不要超过 2min）。
10. 将 PCR 管从磁力架上取出，加入 20 μ L EB Buffer 洗脱。涡旋振荡或吹打混匀纯化磁珠，室温孵育 5min。
11. 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）小心吸取上清至新的灭菌 1.5mL 离心管中，即为 DNA 文库产物。

重要提示：此步骤结束后可以将样品于-20℃或-80℃保存三个月。

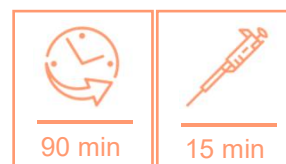
10.6 文库质检

准备材料：

- 步骤 10.5 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。（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

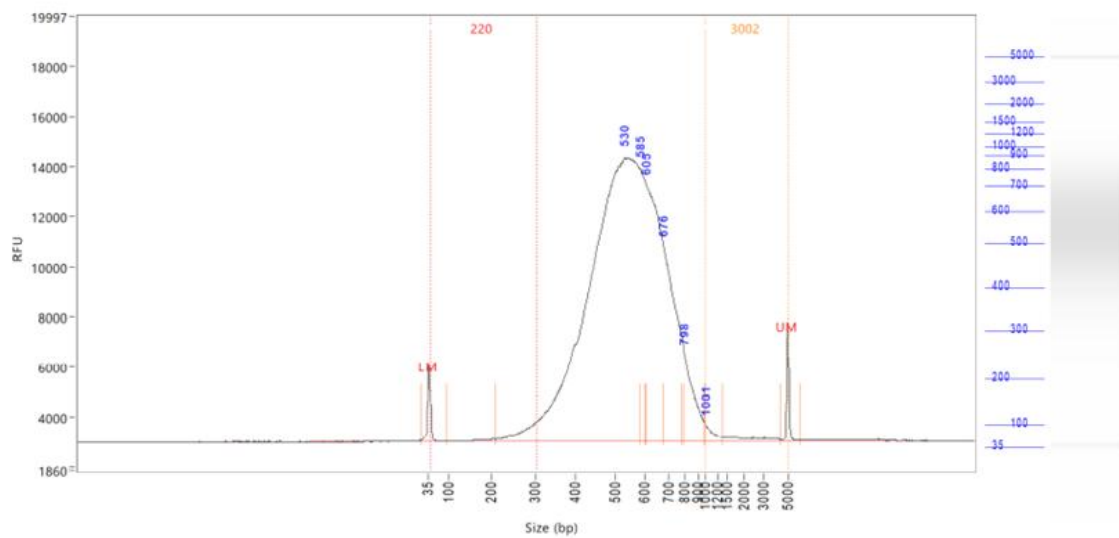


图 11 文库质检图

附录 A 技术原理

AccuraSCOPE® Single Cell Transcriptome and Genome Library Kit 基于 96 孔板设计，利用带有 polyT 尾的磁珠和 ASF TS Primer 从单个细胞中分离出全长 mRNA，经过反转录和 cDNA 扩增，构建包含 96 个样本转录本的混合 RNA-seq 文库；基于等温扩增技术获得全基因组结，并结合 barcode 条形码，构建包含 96 个样本基因组的混合 DNA-seq 文库。通过 barcode 条形码拆分出单个细胞的转录组和基因组信息，从而联合转录组和基因组数据，获得更全面的细胞信息。

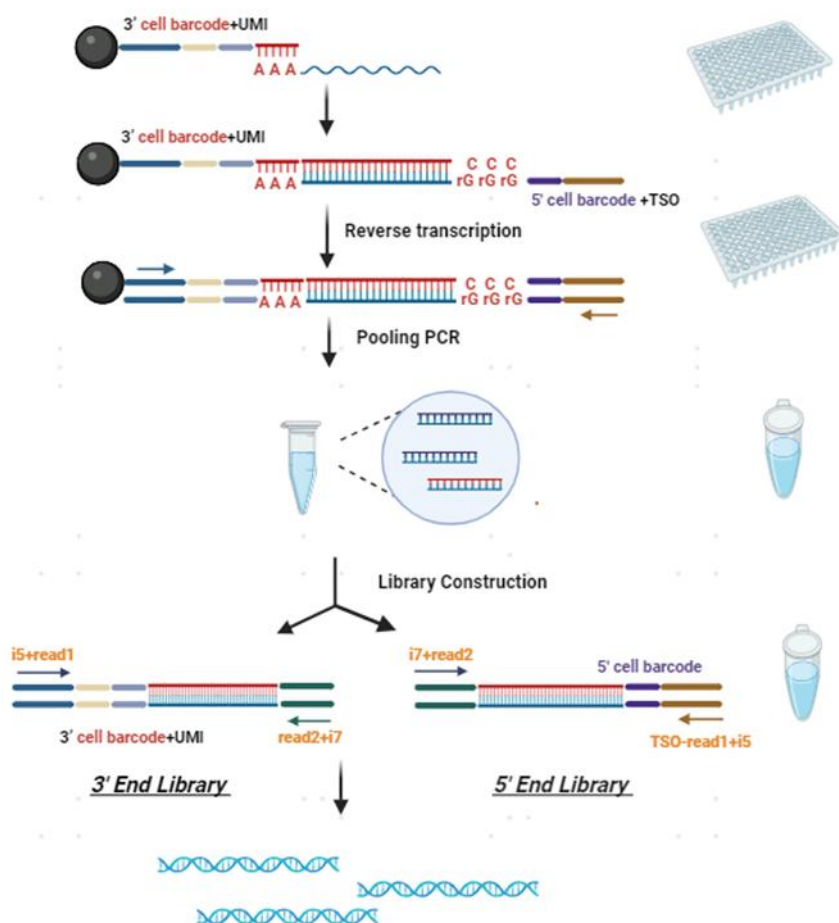


图 A1 磁珠捕获 mRNA 及反转录原理图

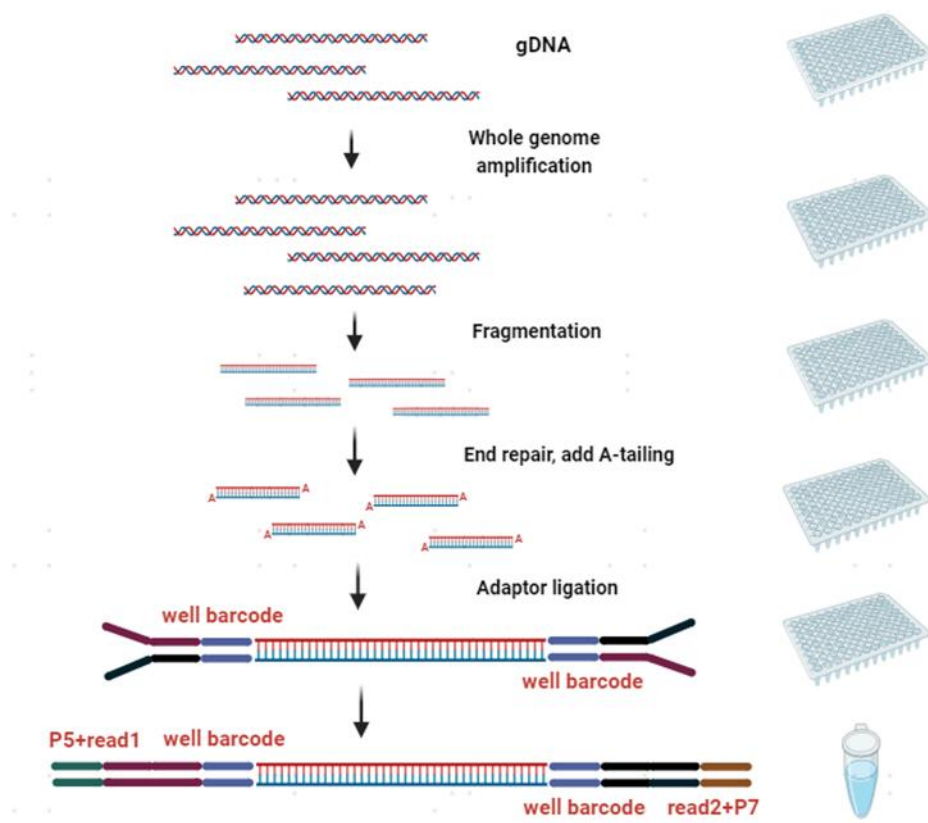


图 A2 DNA-seq 原理示意图

附录 B 测序

转录组文库测序信息

AccuraSCOPE® RNA 文库包括标准的 Illumina 配对末端结构,以 P5 开始,以 P7 结束。Read1 和 Read2 是用于双端测序的标准 Illumina 测序引物位点。Read1 用于测序 9bp 的孔条形码和 12bp 的 UMI, Read2 用于量化基因表达。

RNA-seq:

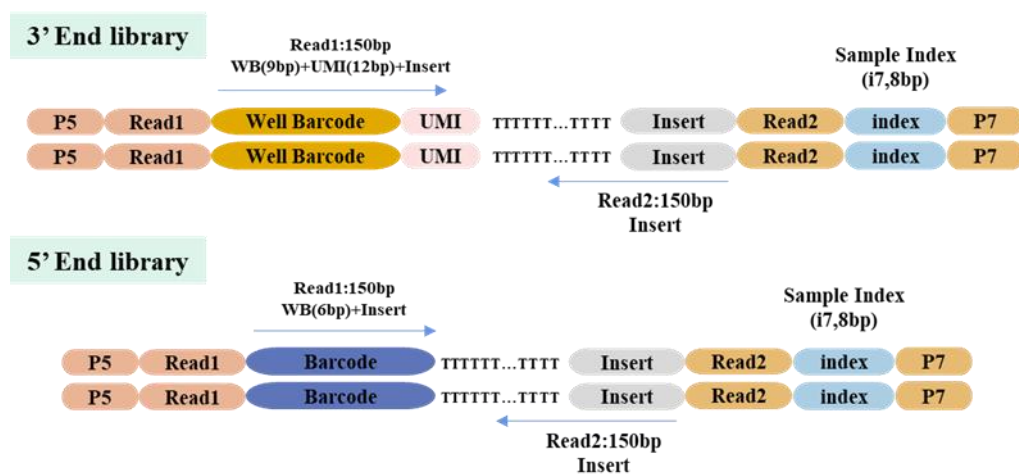


图 B1 转录组测序文库结构

根据具体的实验目的, 建议使用不同的测序深度。每个样品孔的推荐测序深度如下:

- 建议的测序深度: 1–5million / well
- 建议的测序读长: Pair-end 150bp (PE 150)

Read	Read1	i7 Index	i5 Index	Read2
Purpose	Barcode, UMI	Sample Index	N/A	Insert
Length	150	8	0	150

基因组文库测序信息

AccuraSCOPE® DNA 文库包括标准的 Illumina 配对末端结构, 以 P5 开始, 以 P7 结束。Read1 和 Read2 是用于对端测序的标准 Illumina 测序引物位点。Read1 用于对 8bp 的孔条形码进行测序, Read2 用于量化基因。

DNA-seq:

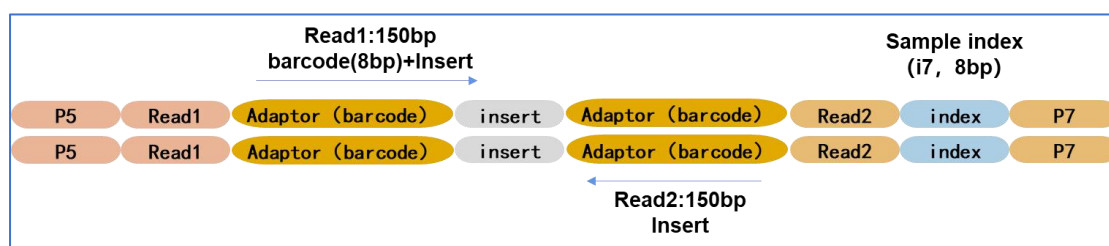


图 B2 基因组测序文库结构

根据具体的实验目的, 建议使用不同的测序深度。每个样品孔的推荐测序深度如下:

- 建议的测序深度: 1GB / well
- 建议的测序读长: Pair-end 150bp (PE 150)

Read	Read1	I7 index	I5 index	Read2
Purpose	Barcode	Sample index	N/A	insert
Length	150	8	0	150

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）