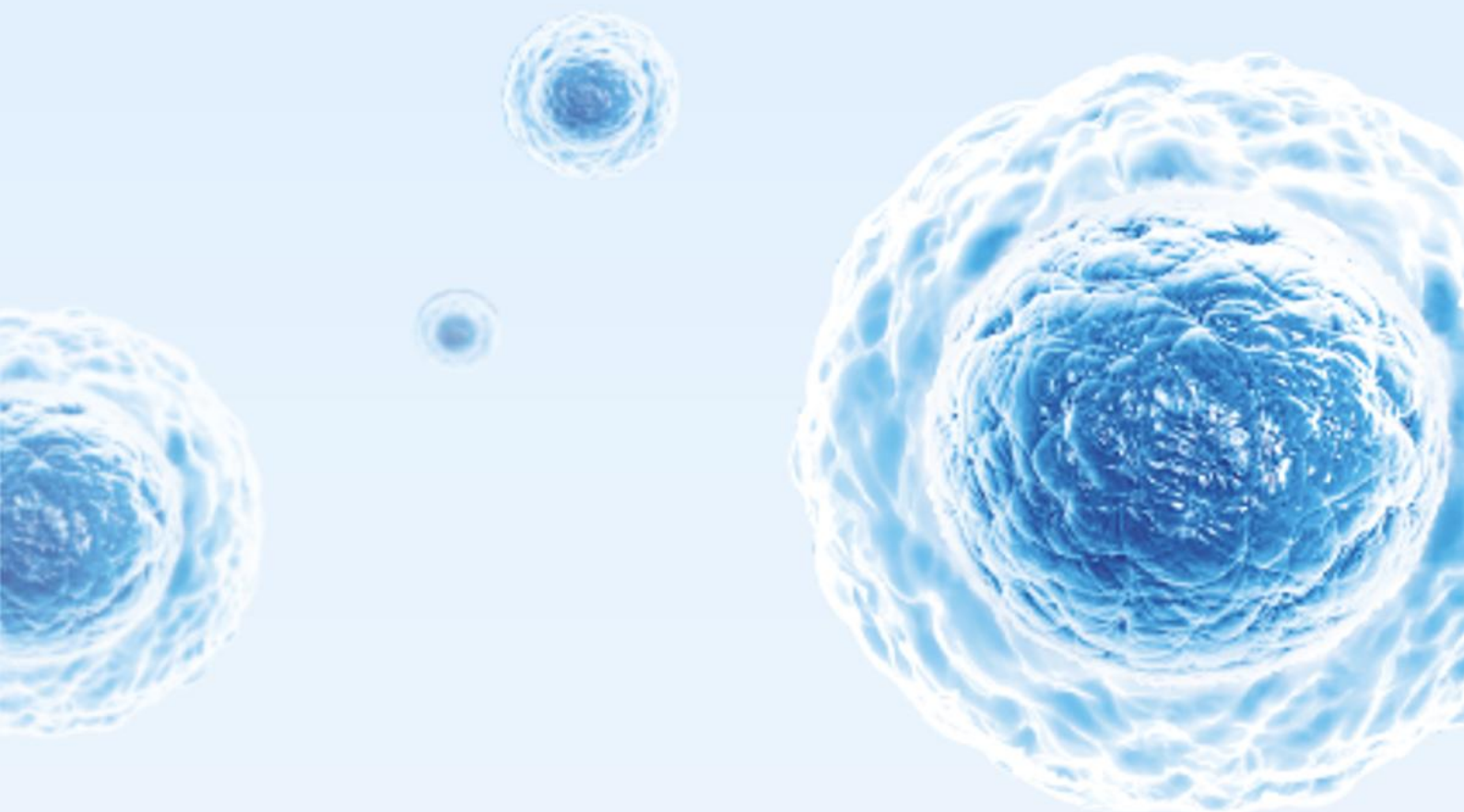




FocuSCOPE®Single Cell mRNA x EBV Library Kit for NEO

单细胞 EB 病毒基因检测试剂盒用户手册·NEO 版

产品规格

目录号	产品品名	规格
41421251	FocuSCOPE® Single Cell mRNA × EBV Library Kit Cell for NEO	4 RXNs
41421221	FocuSCOPE® Single Cell mRNA × EBV Library Kit Cell for NEO	16 RXNs

文件信息

- 文件名称: FocuSCOPE®单细胞 EB 病毒基因检测试剂盒用户手册 NEO 版
- 版 本 号: 2025/04
- 版本日期: 2025.04

历史版本信息

版本信息	修改内容
2025/04	● 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 产品概述	5
2 产品组分及所需耗材	6
2.1 产品组成	6
2.2 自备仪器耗材试剂	9
2.3 技术流程及操作时间	11
3 实验操作	13
3.1 单细胞分离和 mRNA 捕获	13
3.1.1 准备 Lysis Mix 和 EBV Barcoding Beads	13
3.1.2 细胞和微流控芯片准备	14
3.1.3 仪器操作	15
3.2 反转录及扩增	16
3.2.1 反转录	19
3.2.2 PCR 扩增	21
3.2.3 产物纯化	22
3.2.4 扩增纯化产物质检	23
3.2.5 cDNA 二次纯化操作	24
3.3 转录组文库构建	26
3.3.1 片段化	26
3.3.2 接头连接	27
3.3.3 接头连接后产物纯化	28
3.3.4 PCR 富集	29

3.3.5 扩增产物片段分选	30
3.3.6 文库质检	32
3.4 靶基因富集文库构建	34
3.4.1 靶基因序列富集模板纯化	34
3.4.2 靶基因富集	35
3.4.3 靶基因文库构建	37
附录 A 技术原理	40
A1 单细胞分选、mRNA 捕获、反转录及 PCR 富集	40
A2 cDNA 富集	41
A3 转录组文库构建	41
A4 富集文库构建	42
附录 B: 生物废弃物分类及处理标准	43



1 产品概述

FocuSCOPE[®] 单细胞 EB 病毒基因检测试剂盒产品包括单细胞分选至单细胞转录组和靶基因基因序列富集以及富集文库构建全部流程。该产品可高效地完成反转录、cDNA 扩增及转录组文库构建、靶向基因序列富集文库构建；显著提高测序文库产物得率及同等测序深度下靶基因的检出率；另外靶基因富集文库可获得 Barcode 信息，将靶基因表达信息映射至转录组信息上，了解靶基因在不同细胞类型的表达情况，为临床探究 EB 病毒相关肿瘤致瘤机制、分子调控提供科研利器。

2 产品组分及所需耗材

2.1 产品组成

FocuSCOPE® Single Cell mRNA x EBV Library Kit Cell for NEO (4 RXNs)

产品组成名称	组分	体积	储存条件
Single Cell EBV RNA Amplification NEO Chip & Library Reagents	■ Lysis Buffer, Stock	1500μL	-25°C~-15°C
	■ RNase Inhibitor	120μL	
	■ 100 mM DTT	400μL	
	■ RT master Mix	2*400μL	
	■ Reverse Transcriptase	2*50μL	
	■ TS Primer	2*50μL	
	□ Amplification Master Mix	2*400μL	
	□ A primer Mix	200μL	
	■ HiFi PCR PreMix	2*75μL	
	□ EBV Primer Mix1	40μL	
	■ EBV Primer Mix2	20μL	
	□ Amplification Enzyme	2*20μL	
	■ Fragmentation Buffer V3	2*17μL	
	■ Fragmentation Enzyme Mix V3	2*6μL	
	■ 1×TE	800μL	
	■ Ligation Mix	2*72μL	
	■ Ligation booster	2*4μL	
	■ Adaptor	50μL	
	■ MP Master Mix	2*60μL	
	■ Library Amp Mix V3	2*60μL	



	■	Indexing Primer Mix1 (ATCACGTT)	30μL	
	■	Indexing Primer Mix2 (CGATGTTT)	30μL	
	■	Indexing Primer Mix3 (TTAGGCAT)	30μL	
	■	Indexing Primer Mix4 (TGACCACT)	30μL	
	■	EBV Adapter Mix1 (TAAGGCGA)	30μL	
	■	EBV Adapter Mix2 (CGTACTAG)	30μL	
	■	EBV Adapter Mix3 (AGGCAGAA)	30μL	
	■	EBV Adapter Mix4 (TCCTGAGC)	30μL	
	■	EBV Barcoding Beads SD	2*1.8mL	
	■	Wash Buffer A	2*7mL	
NEO-chip & EBV Barcoding Beads	■	Wash Buffer B	2*1.8mL	2°C~8°C
		NEO Chip SD	4 个	

FocuSCOPE® Single Cell mRNA x EBV Library Kit Cell for NEO (16 RXNs)

产品组成名称	组分	体积	储存条件
Single Cell EBV Amplification Reagents SD	■ Lysis Buffer, Stock	2*1500μL	-25°C~-15°C
	■ RNase Inhibitor	300μL	
	■ 100 mM DTT	400μL	
	■ RT master Mix	2*1500μL	
	■ Reverse Transcriptase	400μL	
	■ TS Primer	250μL	
	□ Amplification Master Mix	2*1600μL	
	□ A primer Mix	750μL	
	□ EBV Primer Mix1	160μL	
	□ Amplification Enzyme	160μL	

EBV Library Prep Reagents	■	HiFi PCR PreMix	480μL	-25°C~-15°C
	■	Fragmentation Buffer V3	135μL	
	■	Fragmentation Enzyme Mix V3	40μL	
	■	1×TE	800μL	
	■	Ligation Mix	576μL	
	■	Ligation booster	20μL	
	■	Adaptor	50μL	
	■	MP Master Mix	2*220μL	
	■	EBV Primer Mix2	80μL	
	■	Library Amp Mix V3	480μL	
EBV Library Adapters	■	Indexing Primer Mix1 (ATCACGTT)	30μL	-25°C~-15°C
	■	Indexing Primer Mix2 (CGATGTTT)	30μL	
	■	Indexing Primer Mix3 (TTAGGCAT)	30μL	
	■	Indexing Primer Mix4 (TGACCACT)	30μL	
	■	Indexing Primer Mix5 (ACAGTGGT)	30μL	
	■	Indexing Primer Mix6 (GCCAATGT)	30μL	
	■	Indexing Primer Mix7 (CAGATCTG)	30μL	
	■	Indexing Primer Mix8 (ACTTGATG)	30μL	
	■	EBV Adapter Mix1 (TAAGGCGA)	30μL	
	■	EBV Adapter Mix2 (CGTACTAG)	30μL	
	■	EBV Adapter Mix3 (AGGCAGAA)	30μL	
	■	EBV Adapter Mix4 (TCCTGAGC)	30μL	



	■	EBV Adapter Mix5 (GGACTCCT)	30μL	
	■	EBV Adapter Mix6 (TAGGCATG)	30μL	
	■	EBV Adapter Mix7 (CTCTCTAC)	30μL	
	■	EBV Adapter Mix8 (CAGAGAGG)	30μL	
EBV Barcoding Beads SD	■	EBV Barcoding Beads SD	8*1.8mL	
	■	Wash Buffer A	8*7mL	2°C~8°C
	■	Wash Buffer B	6*1.8mL	
NEO-chip SD		NEO-Chip	16 个	2°C~35°C

2.2 自备仪器耗材试剂

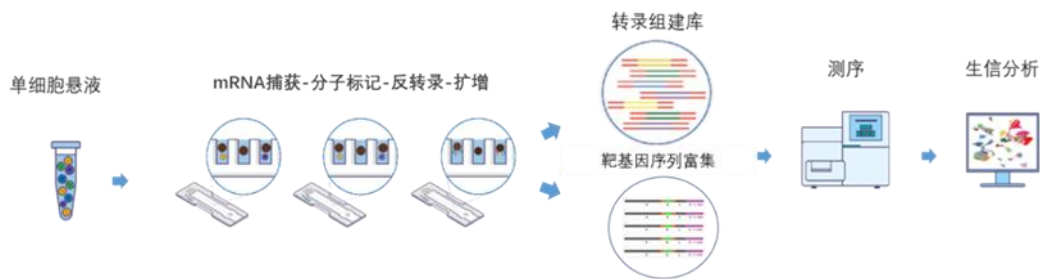
		名称
反转录和扩增 环节	设备	-80°C医用低温保存箱
	仪器	恒温振荡金属浴
		倒置显微镜
		掌上离心机
		振荡涡旋仪
		PCR 仪
		Qubit 4.0 荧光定量仪
	试剂	无水乙醇（分析纯）
		RNase away
		1×PBS（不含 Ca ²⁺ Mg ²⁺ ）
		Tween 20

		Ampure XP 纯化磁珠
		Buffer EB
		Nuclease-free Water
		Qubit dsDNA HS assay kit
	耗材	不同规格无菌&无核酸酶吸头
		1.5mL 无菌&无核酸酶离心管
		0.2mL 无菌&无核酸酶八联排管
		0.6mL PCR 透明薄壁管（Qubit 定量，推荐 Axygen）
	工具	不同量程单道移液器
		DynaMag™-2 磁力架/12321D/Thermo
建库环节	设备	医用冷藏冷冻箱
	仪器	全自动核酸片段分析仪（推荐安捷伦 FA™ -12 Automated CE System）
		Qubit 4.0 荧光定量仪
		掌上离心机
		振荡涡旋仪
	试剂	Ampure XP 纯化磁珠（Backman）
		80%乙醇（用无水乙醇配制，现配现用）
		Buffer EB
		Nuclease-free Water
		Qubit dsDNA HS assay kit



		核酸片段分析仪定量试剂
	耗材	不同规格无菌&无核酸酶吸头
		1.5mL 无菌&无核酸酶离心管
		0.2mL 无菌&无核酸酶八联排管
		0.6mL PCR 透明薄壁管 (Qubit 定量, 推荐 Axygen)
	工具	不同量程单道移液器
		深圳拓能达 磁力架/TND08-C-A

2.3 技术流程及操作时间



步骤	时间	终止&保存
注入细胞	1h	Stop, -80°C≤48h
注入 EBV Barcoding Beads		
mRNA 捕获		
反转录&扩增	2-3h	Stop, 4°C≤72h or -20°C≤7days
建库	3h	Stop, -20°C≤30days
靶基因富集&建库	3h	Stop, -20°C≤30days
全流程时长	9-10h	



3 实验操作

实验操作部分自细胞悬液开始，如果起始材料是实体组织，可参考 sCelLive®组织保存与解离试剂盒用户手册（手动版），以使用 Singleron sCelLiVE®组织解离试剂盒获得高质量的单细胞悬液。

3.1 单细胞分离和 mRNA 捕获

3.1.1 准备 Lysis Mix 和 EBV Barcoding Beads

准备材料： Lysis Buffer, Stock ; 100 mM DTT; RNase Inhibitor; EBV Barcoding Beads。

自备材料： 1×PBS 缓冲液；不同量程单通道移液器；1.5 mL 离心管；DynaMag™-2 磁力架。

1. 体系配置：室温解冻“Lysis Buffer, Stock”和“100mM DTT”，涡旋离心后置于冰上。

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。

组分	1 RXN (μL) ×1	2 RXNs (μL) ×2.2
Lysis Buffer, Stock	138.7	305.1
100mM DTT	7.5	16.5
RNase Inhibitor	3.8	8.4
Total	150	330

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

3.1.2 细胞和微流控芯片准备

准备材料：微流控芯片；细胞悬液。

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。

1. 分离后的细胞重悬于预冷的 PBS 内, 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 1.5×10^5 - 3.5×10^5 cells/mL，即可用于芯片实验。

目标细胞数	建议细胞浓度
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
24000-30000	(4.0-5.0) $\times 10^5$ cells /mL

2、取出微流控芯片确认进样口与出样口，如图 3-1-2-1。

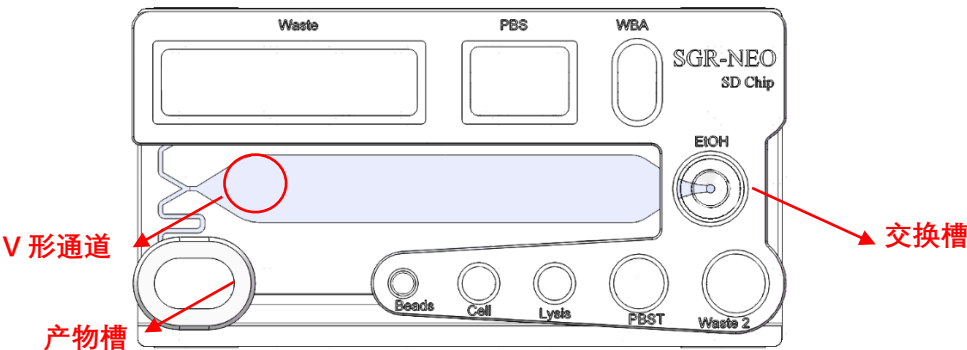


图 3-1-2-1 微流控芯片示意图

3、将微流控芯片置于无菌的培养皿上，用移液器（200μL 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 μL

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 500ul Wash Buffer A 润洗产物槽 2 次。

3.1.3 仪器操作

准备材料：

- Singleron Matrix NEO® ；
- Wash Buffer A（白色）；
- Lysis Mix、EBV Barcode Beads（来自 3.1.1 步骤）；
- 微流控芯片（NEO-chip SD）；
- 细胞悬液（来自 3.1..2 步骤）。

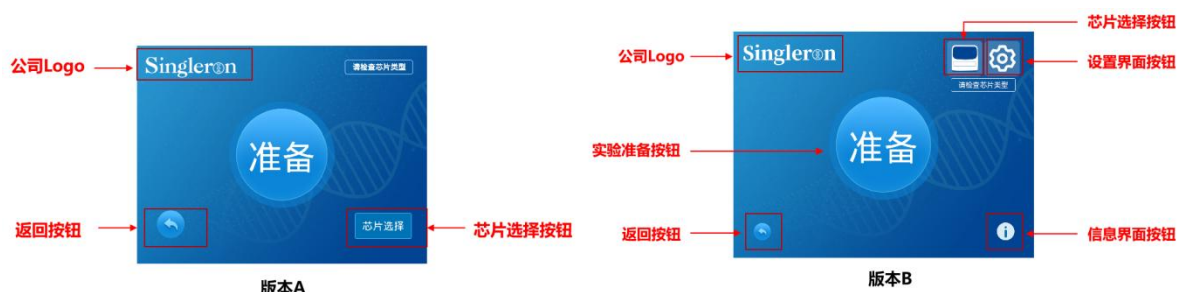
自备材料：

- 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

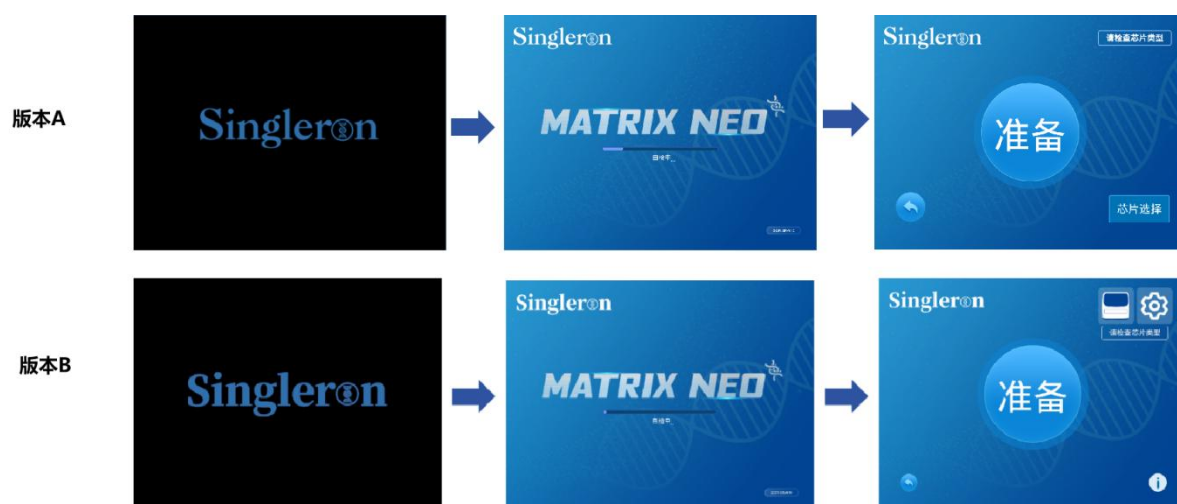
本仪器提供两种界面版本：版本 A 和版本 B。两种界面在布局及部分操作方式上有所不同。

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
------	----

EBV Barcoding Beads	80 μ L
细胞悬液	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 “3.1.1 准备 Lysis Mix 和 EBV Barcoding Beads” 。

2.细胞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 EBV 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。

3.2 反转录及扩增

3.2.1 反转录

准备材料： RT Master Mix; TS primer; Reverse Transcriptase; RNase Inhibitor; Wash Buffer A; Wash Buffer B; 回收的 EBV Barcoding Beads (来自 3.1)。

自备材料： Nuclease-free Water; 恒温震荡金属浴; 涡旋仪; 不同量程单通道移液器; 1.5mL 离心管; DynaMag™-2 磁力架。

Notice:

- (1) 为防止 RNA 降解，实验开始前用 RNase away 喷洒实验台，5min 后擦干。
- (2) 恒温震荡金属浴提前预热，并保持在 42°C

1. 体系配置：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）。

组分	1 RXN (μL) $\times 1$	2 RXNs (μL) $\times 2.2$
RT Master Mix	120	264
TS primer	10	22
Reverse Transcriptase	20	44
RNase Inhibitor	5	11
Nuclease-free Water	45	99
Total	200	440

注：移液器轻轻吹打混匀试剂溶液，确保试剂溶液澄清后再使用。

2. 将 3.1.7 步骤的装有 EBV Barcoding 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 预冷的 Wash Buffer A，吹打混匀后短暂离心，置于磁力架上，待溶液澄清后小心移除上清。

3. 从磁力架上取下离心管，加入 500 μL 预冷的 Wash Buffer B，涡旋混匀后短暂离心，置于磁力架上，待溶液澄清后小心移除上清。

4. 取下离心管，短暂离心后再置于磁力架上，用 20 μL 的移液器吸取残余的液体。只留下离心管底部的 EBV Barcoding Beads。

5. 迅速取下离心管，加入 200 μL 配好的 RT Mix，并使用移液器轻柔混匀。

6. 置于提前设置好的金属浴中，42°C，转速 1300 rpm，反应 90min（提前预热）。



注：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）。

3.2.2 PCR 扩增

准备材料：Amplification Master Mix; A Primer Mix; EBV Primer Mix1; Amplification Enzyme; 反转录产物（来自 3.2.1）。

自备材料：Nuclease-free Water; PCR 仪; 不同量程单通道移液器; 1.5mL 离心管; 八联排管; DynaMag™-2 磁力架。

1. 体系配置：提前室温解冻 “Amplification Master Mix” ， “A Primer Mix” ， “EBV Primer Mix1” 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。

组分	1 RXN (μL) ×1	2 RXNs (μL) ×2.2
Amplification Master Mix	172	378.4
A Primer Mix	32	70.4
EBV Primer Mix1	10	22
Amplification Enzyme	8	17.6
Nuclease-free Water	178	391.6
Total	400	880

2. 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。

3. 将离心管从磁力架上取下，向管中加入 400 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。

4. 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，PCR 程序见下表。

Step	Temperature	Time
1	95℃	0:03:00
2 cycle=4	98℃	0:00:20
	65℃	0:00:45
	72℃	0:03:00
3 cycle=10	98℃	0:00:20
	67℃	0:00:20
	72℃	0:03:00
4	72℃	0:05:00
5	4℃	Hold

注：PCR 程序运行结束后，可将扩增产物在 4℃保存 72h 和-20℃保存一周，或者直接进行 cDNA 扩增纯化。

3.2.3 产物纯化

准备材料：PCR 扩增产物（来自 3.2.2）

自备材料：Ampure XP 纯化磁珠；新配制的 80% 乙醇；Buffer EB（10mM Tris-HCl pH 8.0 or Elution Buffer）；不同量程单通道移液器；1.5mL 离心管；DynaMag™-2 磁力架。

Notice:

Ampure XP 纯化磁珠（以下简称磁珠）

（1）提前 30min 从 4℃ 中取出，恢复室温。



(2) 磁珠使用前需充分涡旋 15s 振荡混匀。

(3) 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。

(4) 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 2 mL 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 $0.6 \times 400 = 240\mu\text{L}$ 纯化磁珠，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 离心管中保存，用于靶基因富集文库构建。

2. 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。

3. 重复步骤 2，共计漂洗 2 次。

4. 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 5min。

5. 取下离心管，加入 20 μ L Buffer EB，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。

6. 吸取上清并转移至新的 1.5mL 离心管中，即为纯化产物。

注：将样品于 4°C 可保存 72h，在 -20°C 可保存 1 周，或者可直接进行 cDNA 扩增纯化后的 QC 和定量。

3.2.4 扩增纯化产物质检

准备材料：cDNA 产物（来自 3.2.3）

自备材料：Qubit 4.0 荧光定量仪及配套试剂；全自动核酸片段分析仪及配套试剂；单通道

移液器。

1. 取适量（建议 1μL）样品进行 cDNA 浓度和片段大小检测。

推荐使用 Qubit 进行 cDNA 浓度检测，具体实验操作参见 **Qubit 荧光定量仪操作与维护规程**。推荐使用 Agilent 片段分析仪进行片段大小检测，具体实验操作参见 **Agilent 片段分析仪使用说明手册**。

2. 质检结果请参照图 3-2-4，合格 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%。

质控等级	评判标准	对应处理
合格	Qubit 检测总量 > 100ng，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

注：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”。

3.2.5 cDNA 二次纯化操作

若质检发现 cDNA 300bp 以下片段占比在 10-40%时，需要进行二次纯化：

1. 将剩余 cDNA 的体积用 NF 水补充到 100ul；
2. 按照如下表格的推荐纯化磁珠的比例加入纯化磁珠；

40bp-300bp 占比	纯化磁珠比例
---------------	--------



10%-20%	0.8×
20%-35%	0.7×
>35%	0.6×

*cDNA 总量低于 40ng、小片段占比>40%的，0.7×纯化； cDNA 二次纯化比例不能低于 0.6×。

3. 其余操作方式与 3.2.4 相同，最终用 15ul 的 EB Buffer 洗脱 cDNA。

4. 二次纯化后一般只需要测定 Qubit 值，不再需要核酸片段的质检。

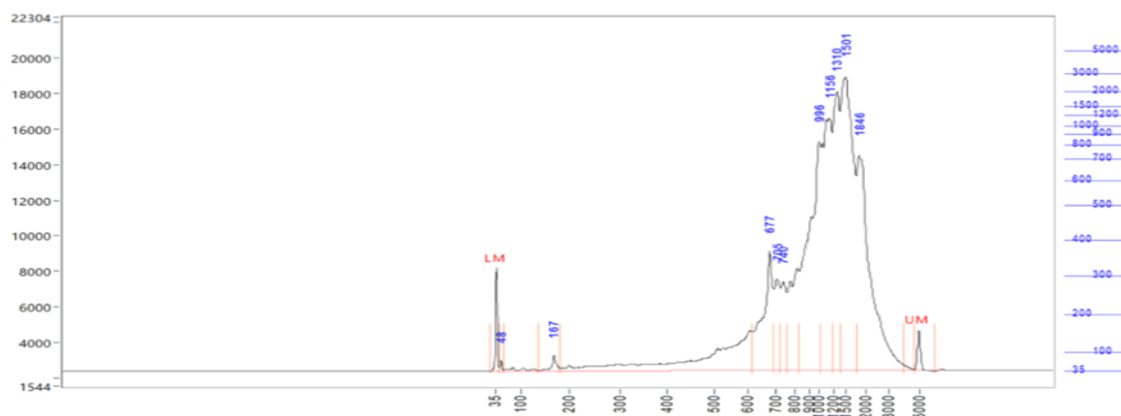


图 3-2-4 cDNA 质检图

3.3 转录组文库构建

3.3.1 片段化

准备材料： Fragmentation Buffer V3; Fragmentation Enzyme Mix V3; 1×TE; cDNA 产物（来自 3.2.4）。

自备材料： PCR 仪; 不同量程单通道移液器; 灭菌的 PCR 管。

Notice:

产物片段化时，必须提前设置 PCR 程序，并使 PCR 仪热盖保持在 75℃。

1. 提前按照下表设置 PCR 程序，反应体积 35μL，并使 PCR 仪热盖保持在 75℃。

Step	Temperature	Time
1	4℃	Hold
2	37℃	0:10:00
3	65℃	0:30:00
4	4℃	Hold

注：第一步程序设置的目的是预冷 PCR，为孵育做准备。

2. 室温解冻 Fragmentation Buffer V3，确保完全融化，涡旋混匀并短暂离心后冰上备用；

使用前将 Fragmentation Enzyme Mix V3 涡旋振荡并瞬离，置于冰上备用。

3. 将灭菌的 PCR 管置于冰上，配置如下反应体系：

Component	Volume (μL)
Fragmentation Buffer V3	7
Fragmentation Enzyme Mix V3	2
cDNA（质检合格 Step 3.2.3 产物）	Variable



1×TE

Variable

Total

35

注：① cDNA 总量大于 100ng 时，投入 50ng 进行建库。

② cDNA 总量在 25-100ng 时，选择 10ng 投入量进行建库。

③ cDNA 总量小于 25ng 时，投入总量的 40%进行建库。

注意：建议 cDNA 预留二次建库的量。

4. 用移液器轻柔吹打充分混匀，瞬离后将 PCR 管置于 PCR 仪中，跳过 PCR 程序第一步。

5. 完成反应后立即进行下一步接头连接。

3.3.2 接头连接

准备材料：Ligation Mix; Ligation booster; Adaptor; 片段化产物（来自 3.3.1）。

自备材料：PCR 仪; 不同量程单通道移液器。

Notice： 接头连接时，必须提前设置 PCR 程序，**并关闭** PCR 仪热盖加热功能。

1. 提前按照下表设置 PCR 程序，反应体系 70μL，**并关闭** PCR 仪热盖加热功能。

Step	Temperature	Time
1	4°C	Hold
2	20°C	0:15:00
3	4°C	Hold

注：第一步程序设置的目的是预冷 PCR，为孵育做准备。

2. 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）。

3. 将上一步反应的 PCR 管置于冰上，配置如下反应体系：

Component	Volume (μL)
片段化 产物 (Step3.3.1 产物)	35
Ligation Mix	30
Ligation booster	1
Adaptor	2.5
Total	68.5

4. 涡旋混匀并瞬离。将反应管置于 PCR 仪中。

3.3.3 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）；接头连接产物（来自 3.3.2）。

自备材料：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；无菌 PCR 管；磁力架/TND08-C-A/深圳拓能达。

Notice:

Ampure XP 纯化磁珠（以下简称磁珠）

- （1）提前 30min 从 4℃ 中取出，恢复室温备用。
- （2）磁珠使用前需充分涡旋 15s 振荡混匀。
- （3）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。
- （4）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. 每反应提前准备 0.5mL 80%乙醇和 25μL 0.1×TE。将产物 PCR 管短暂离心，用移液器



测量体积，涡旋 15s 混匀磁珠，磁珠体积为 0.2x 产物总体积。

例如：片段化产物体积为 68.5 μL ，则应使用 $0.2 \times 68.5 = 13.7\mu\text{L}$ Ampure XP 纯化磁珠，

室温孵育 5min，涡旋充分混匀，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。

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，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 PCR 管中，暂时留存。

3. 保持 PCR 管置于磁力架上，用 200 μL 新鲜配制的 80%乙醇漂洗磁珠，室温孵育 30s，小心移除上清。

4. 重复步骤 3，总计漂洗 2 次。

5. 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）。

6. 将纯化磁珠所在 PCR 管从磁力架上取下，加入 17 μL 0.1 $\times$ TE，涡旋振荡 15s 混匀磁珠，室温孵育 5min。

7. 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 μL 上清至新的灭菌 PCR 管中用于步骤 3.3.4 PCR 富集。

注：此步骤结束后可以将样品于 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存 72h 或 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存一周。

3.3.4 PCR 富集

准备材料：Library Amp Mix V3; Indexing Primer Mix; 接头连接后纯化产物（来自 3.3.3）。

自备材料：PCR 仪；不同量程单通道移液器。

1. 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。

Component	Volume (μL)
接头连接纯化后产物 (Step3.3.3 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。

2. 提前按照下表设置 PCR 程序，并使 PCR 仪热盖保持在 105℃，反应体积 50μL。

Step	Temperature	Time
1	98℃	0:00:30
2 （循环数参见下表）	98℃	0:00:10
	65℃	0:01:15
3	65℃	0:05:00
4	4℃	Hold

扩增循环数需按 cDNA 投入量进行选择，选择要求如下：

投入量	参考循环数
50ng	10
10ng	12
不足 10ng	13

3.3.5 扩增产物片段分选

准备材料：PCR 富集产物（来自 3.3.4）



自备材料：Buffer EB; Ampure XP 纯化磁珠；新鲜配制的 80%乙醇；不同量程单通道移液器；无菌 PCR 管；1.5mL 离心管；磁力架/TND08-C-A/深圳拓能达。

Notice:

Ampure XP 纯化磁珠（以下简称磁珠）

- (1) 磁珠使用前需充分涡旋 15s 振荡混匀。
- (2) 磁珠比较粘稠, 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。
- (3) 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 0.5mL 80%乙醇。纯化磁珠提前 30min 从 4°C中取出, 恢复室温备用。将 3.3.4 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 $0.5 \times 50 = 25 \mu\text{L}$ Ampure XP 纯化磁珠 (如体积不足 50 μ L 使用 Nuclease-free Water 补足), 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。

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 7.5 μ L (0.1 $\times$ 75 μ L) 加入至上清液 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 5，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 2min（不要超过 5min）。
8. 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。
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）小心吸取上清至新的灭菌 1.5mL 离心管中，-20℃保存一个月或-80℃可以保存三个月。

3.3.6 文库质检

准备材料：片段分选产物（来自 3.3.5）

自备材料：全自动核酸片段分析仪及配套试剂；单通道移液器。

1. 取适量（建议 1μL）样品进行产物浓度和片段大小检测。
2. 主峰片段范围须在 400bp-700bp 之间，900bp-5000bp 占比<10%。若存在 200bp 左右小尖峰凸起，可 0.8×纯化后送测。

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-

不建议上机测序

500bp 占比<30%

3. 质检合格的文库，可直接送测序，也可置于-20℃冰箱保存 30 天，如文库没有直接送测，送测前需再进行一次质检。

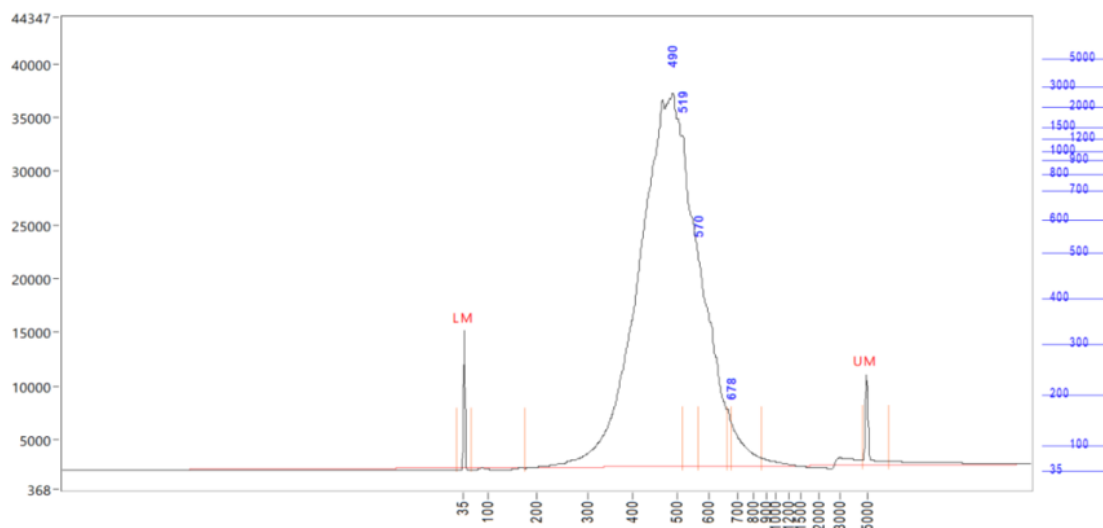


图 3-3-6 文库质检图

3.4 靶基因富集文库构建

3.4.1 靶基因序列富集模板纯化

准备材料： cDNA 产物纯化上清液（来自 3.2.3 步骤 1）

自备材料： Ampure XP 纯化磁珠；新配制的 80% 乙醇；Buffer EB（10mM Tris-HCl pH 8.0 or Elution Buffer）；不同量程单通道移液器；1.5mL 离心管；DynaMag™-2 磁力架。

Notice:

Ampure XP 纯化磁珠（以下简称磁珠）

- （1）提前 30min 从 4℃ 中取出，恢复室温。
- （2）磁珠使用前需充分涡旋 15s 振荡混匀。
- （3）磁珠比较粘稠，应确保精确量取，缓慢加入，否则会导致分选的片段长度与预期不一致。
- （4）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 2mL 80%乙醇。取 200μL 步骤 3.2.3 cDNA 产物纯化上清液收集到 1.5mL 离心管中，加入 75μL 纯化磁珠，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，小心移除上清至新的 1.5mL 离心管中，暂留。
2. 保持离心管始终处于磁力架上，加入 800μL 新配制的 80% 乙醇漂洗磁珠。室温孵育 30s，小心移除上清。
3. 重复步骤 2，共计漂洗 2 次。
4. 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。
5. 取下离心管，加入 20μL Buffer EB，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。

6. 吸取上清并转移至新的 1.5mL 离心管中，即为纯化产物。

注：将样品置于 4°C 可保存 72h 或在 -20°C 保存一周，或者直接进行 EB 病毒基因序列富集。

8. 取 1μL 样品进行 Qubit 浓度检测，产物浓度应大于 1 ng/μL。

3.4.2 靶基因富集

准备材料：上清纯化产物（来自 3.4.1）；MP Master Mix；EBV Primer Mix2；

自备耗材：磁力架/TND08-C-A/深圳拓能达；Ampure XP 纯化磁珠。

1. 取 20ng 3.4.1 产物，将 PCR 管置于冰上按照如下表格配制第一轮富集 PCR mix，

Component	Volume (μL)
MP Master Mix	25
EBV Primer Mix2	3.6
Nuclease-free Water	Variable
20ng 上清纯化产物(来自 3.4.1)	Variable
Total	50

2. 使用涡旋仪轻柔充分混匀并短暂离心，将反应管置于 PCR 仪中，PCR 仪根据下表设置并运行反应，PCR 仪热盖 105°C：

步骤	温度	时间
1	95°C	0:15:00
2 cycle=14	94°C	0:00:30
	60°C	0:01:30
	72°C	0:01:30
3	72°C	0:10:00
4	4°C	Hold

3. 产物纯化

1) 磁珠 (纯化磁珠) 提前 30min 从 4°C 中取出, 恢复室温; 每反应准备 0.5mL 80%乙醇。。

注: 磁珠使用前需混匀。

2) 将 PCR 管中的液体, 瞬离, 计算体积。磁珠体积为 0.8×产物体积。

例如: 产物体积 50μL, 则加入 $0.8 \times 50 = 40\mu\text{L}$ 磁珠, 吹打混匀后, 室温孵育 5min, 短暂离心, 置于磁力架上静置 5min; 至液体透明澄清, 小心移除上清至新的 PCR 管中, 暂留。

注: 磁珠较粘稠, 准确移取相应体积, 否则可能导致分选片段长度与预期不一致。

3) 保持 PCR 管始终处于磁力架上, 加入 200μL 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 3, 共计漂洗 2 次。

5) 取下 PCR 管, 短暂离心, 再次置于磁力架上, 吸去多余酒精, 晾干约 2min (不超过 5min)。

6) 取下 PCR 管, 加入 20μL Buffer EB, 吹吸混匀磁珠, 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 EP 管中, 即为纯化产物。

注: 将样品置于 4°C 可保存 72h 或在 -20°C 保存 1 周, 或者直接进行后续 QC 和定量。



4. 扩增纯化产物质检

1) 取 1 μ L 样品进行 Qubit 浓度检测。

3.4.3 靶基因文库构建

实验材料：EBV Adapter Mix; HiFi PCR PreMix ;3.4.2 产物。

自备材料：PCR 管；Nuclease-free water; AMPure XP 磁珠；80%乙醇；磁力架。

1. 取 20ng Step 3.4.2 产物，将 PCR 管置于冰上按照如下表格配制第二轮富集 PCR mix,

Component	Volume (μ L)
EBV Adapter Mix	1.5
HiFi PCR PreMix	25
Nuclease-free Water	variable
Step 3.4.2 产物 (20ng)	variable
Total	50

注：EBV Adapter Mix 包括多种，任意选择一种即可。

2.使用涡旋仪轻柔充分混匀，将反应管置于 PCR 仪中，PCR 仪根据下表设置并运行反应，PCR

仪热盖 105°C：

步骤	温度	时间
1	95°C	0:03:00
2 cycle=10	98°C	0:00:20
	64°C	0:00:30
	72°C	0:01:00
	72°C	0:05:00

3.产物纯化

1) 提前 30min 取出纯化磁珠，恢复室温，备用；每反应准备 0.5mL 80%乙醇。将 PCR 管瞬离，量取 PCR 产物体积，磁珠体积为 $0.8 \times$ 产物体积。

例如：产物体积 50 μ L，则加入 $0.8 \times 50 = 40\mu$ L 磁珠，涡旋振荡或使用移液器吹打 10 次充分混匀，室温孵育 5 min。

2) 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 5 min)，小心移除上清。

3) 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 30 s，小心移除上清。

4) 重复步骤 3)，总计漂洗 2 次。

5) 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，开盖晾干磁珠约 2 min（不超过 5min）。

6) 将 PCR 管从磁力架上取出，加入 20 μ L EB Buffer 洗脱。涡旋振荡使磁珠和液体充分混匀，室温孵育 5 min。

7) 将 PCR 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 5 min)小心吸取 18 μ L 上清至新的灭菌 PCR 管中。

注：将样品置于 4°C 可保存 72h 或在 -20°C 保存 1 周，或者直接进行后续 QC 和定量。

4. 扩增纯化产物质检

1) 取 1 μ L 样品进行 Qubit 浓度检测。

2) 取 2 μ L 样品进行片段大小的检测。



注意：样品浓度过高时需要将样品稀释到 3-5 ng/ μ L，防止浓度过高，影响质检果。质检结果请参照图 3-5-2。

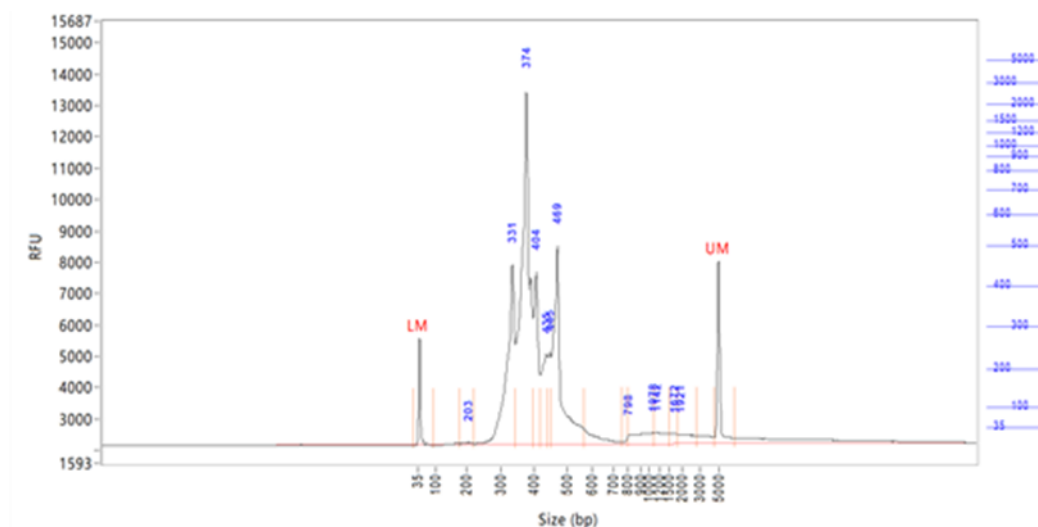


图 3-5-2 富集文库产物质检图

注：由于检测机器精度不同，理论大小可能和实际检测略有差异。由于不同组织样本基因表达差异，主峰可能会发生变化，一般分布为 300bp~500bp，占比一般大于 50%，片段>500bp 为非目标条带。

附录 A 技术原理

利用 FocuSCOPE® 微流控芯片捕获单细胞，并将数百万个携带独特细胞标签的 EBV Barcoding Beads 加入到芯片微孔中，确保每个微孔内只落入 1 个 EBV Barcoding Beads。细胞裂解后，带有独特细胞标签（EBV Cell Barcoding）及分子标签（UMI）的磁珠通过与 mRNA 上的 poly (A) 尾结合捕获 mRNA，对 mRNA 和细胞进行标记。收集芯片中的 EBV Barcoding Beads，将 EBV Barcoding 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 测序平台的转录组测序文库，同时利用 cDNA 为模板进行多重 PCR 富集 EB 病毒靶基因。

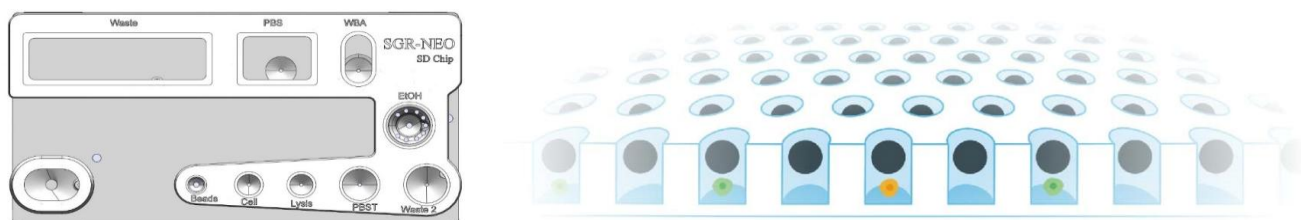


图 A1：NEO-chip®微流控芯片外形（左）及细微结构（右）

A1 单细胞分选、mRNA 捕获、反转录及 PCR 富集

通过进样口将一定数量的细胞注入到 NEO-chip®微流控芯片，根据“泊松分布”的原理完成单个细胞的分离，利用 EBV Barcoding Beads 完成单个细胞的 mRNA 的捕获和标记。EBV Barcoding Beads 的 Oligo 序列包含 illumina Read 1 测序引物序列，细胞标签（Cell Barcode），分子标签(UMI)和 PolyT 核苷酸序列或靶向探针。

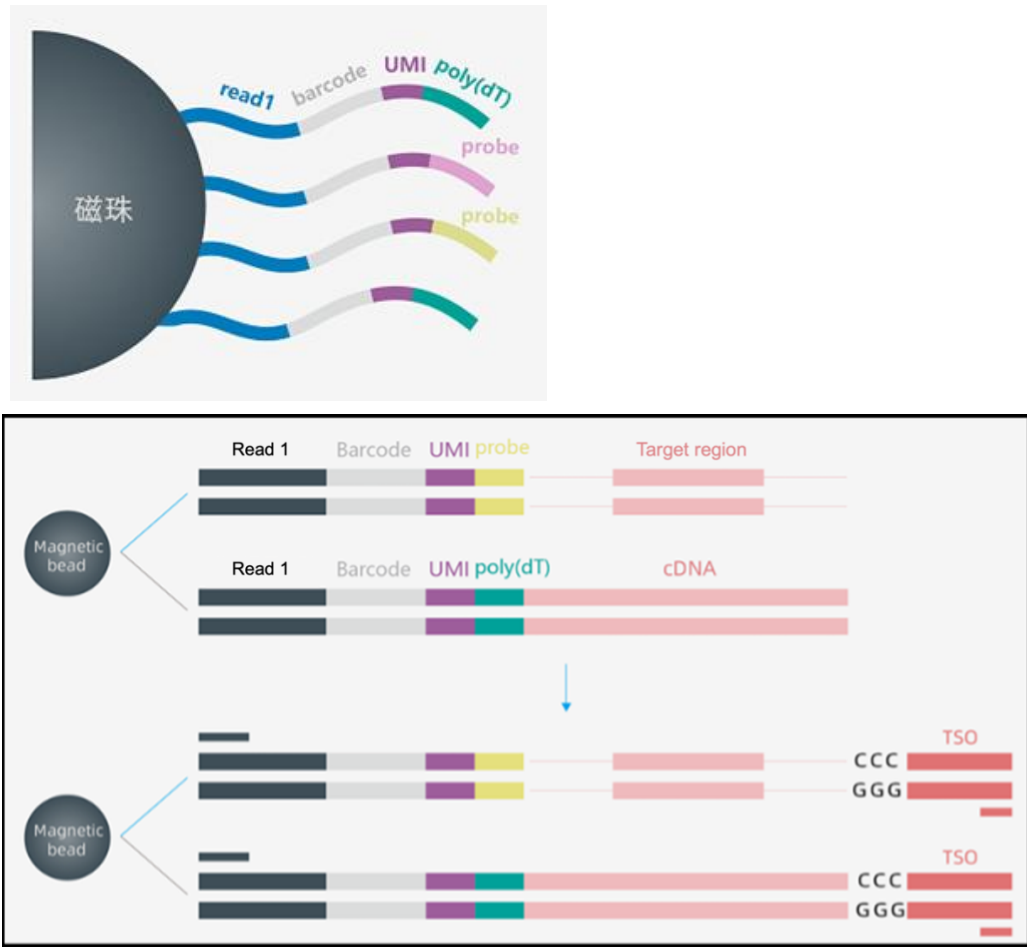


图 A2：磁珠捕获 mRNA 及反转录原理图

注：模板转化引物（TS Primer），简称 TSO（Template Switching Oligo）。

A2 cDNA 富集

Singleron Barcoding 全长 cDNA，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。

A3 转录组文库构建

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。

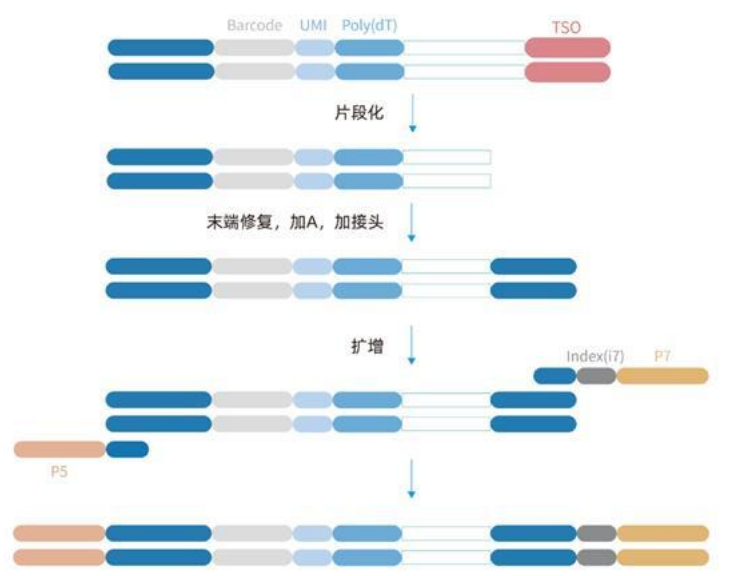


图 A3：转录组文库构建原理图

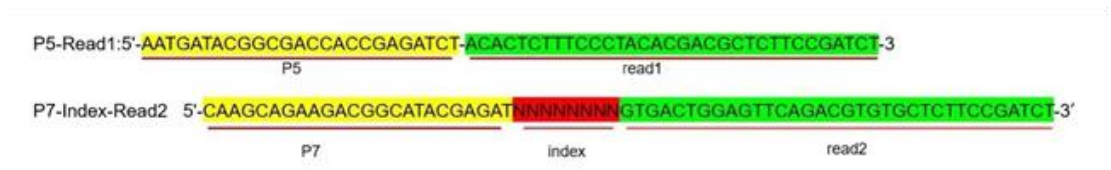


图 A4：转录组 illumina 文库结构图（左右两侧序列）

A4 富集文库构建

EBV Barcoding Beads 捕获 EB 病毒基因转录本并通过 RT-PCR 获得 cDNA,再以 cDNA 为模板，EBV Barcoding Beads 特异富集引物对靶基因序列进行富集，通过低循环扩增技术，特异性完成靶基因富集文库构建。



图 A5：靶向富集文库构建原理

附录 B：生物废弃物分类及处理标准

● 生物废弃物分类及处理目的

规范实验室在生产过程中所产生的危险性废弃物的收集、贮存、处置的行为，加强危险性废弃物的安全管理，防止生物污染，保护环境，保障人员健康。

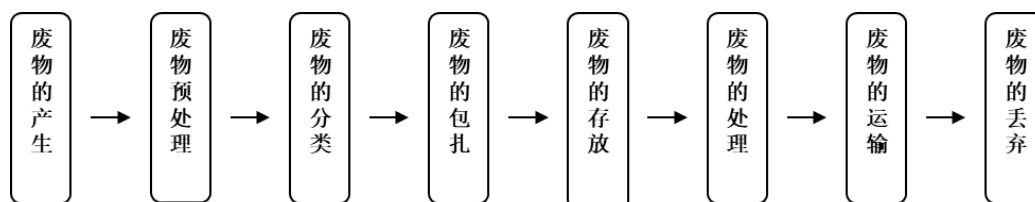


图 1 危险性废弃物管理工作守则流程图

● 生物废弃物分类

样本制备的过程，主要废弃物包含液体生物废弃物(废液槽，以及各个使用后剩余残留的试剂)，以及固体生物废弃物(微流控芯片，连接模块)，一般非生物医疗废弃物，各废弃物分类定义如下，在操作中所产生的废弃物需依照定义分类回收，并依照对应的处理方法进行处理。

凡与危险性废弃物产生有关的人均须接受培训，使其能辨认该类废弃物并作适当分类，以确保废弃物包扎正确及安全妥当回收。

1. 实验废弃液、废弃培养基及初次清洗废弃水（此类主要是化学性废弃物）。

实验废弃液：实验过程中所使用的试剂、试剂的混合物、试剂与其它物质（细胞悬液、磁珠等）的混合物所产生的废弃的液态或半固态物质。比如：PBS、HBSS 等（Nuclease-free Water 除外）。

2. 废弃包装、容器、废弃实验耗材等。

1) 试剂或化学品的内包装：直接与试剂或化学品接触的瓶、管、盒、塑料等。

2) 废弃样本：组织样本、细胞样本、血液样本等的剩余样本。需要单独分开存放、收集和放置;此类主要是感染性废弃物、病理性废弃物。

3) 非生物医疗性废弃物（生活垃圾）：由实验室在生产过程中产生的，但无潜在传染性的废弃物，如试剂的外包装、打印的废弃报告单、各种辅助材料外包装等无接触到危险性或生物医疗废弃物质。

● 生物废弃物的收集、存放与处理

1. 实验室应当用有盖的废弃物桶来收集废弃物（医疗废弃物标志如下图）。
2. 非危险性废弃物由生物安全员收集后放在指定的废弃物存放处。
3. 生物安全员收集的危险性废弃物在入库前，固态危废需检查是否包装捆扎好，检查有无破损溢出的情况，相应标识是否粘贴，确认正常后进行称重，然后进行入库操作，入库后放入吨袋中，整齐有序地进行堆放；液态危废先将小号废液桶里的废液进行称重，检查有无泄漏，相应标识是否粘贴，确认正常后进行入库操作，倒入危废暂存间内的 50L 的大危废储存桶内，并及时进行密封。
4. 非危险性废弃物及生活废弃物由平台公司的人员收集处理。
5. 危险性废弃物丢置注意事项：

1) 经污染的利器是唯一会对处理者构成感染危险的危险性废弃物。它们必须弃置于非刺穿的利器盒内，以便送至专业处理地。

2) 化学性废弃物中批量的废化学试剂、废消毒剂应当交由专门机构处置。

3) 包装好或容器内的感染性废弃物、病理性废弃物、损伤性废弃物不得取出。





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：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）

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）