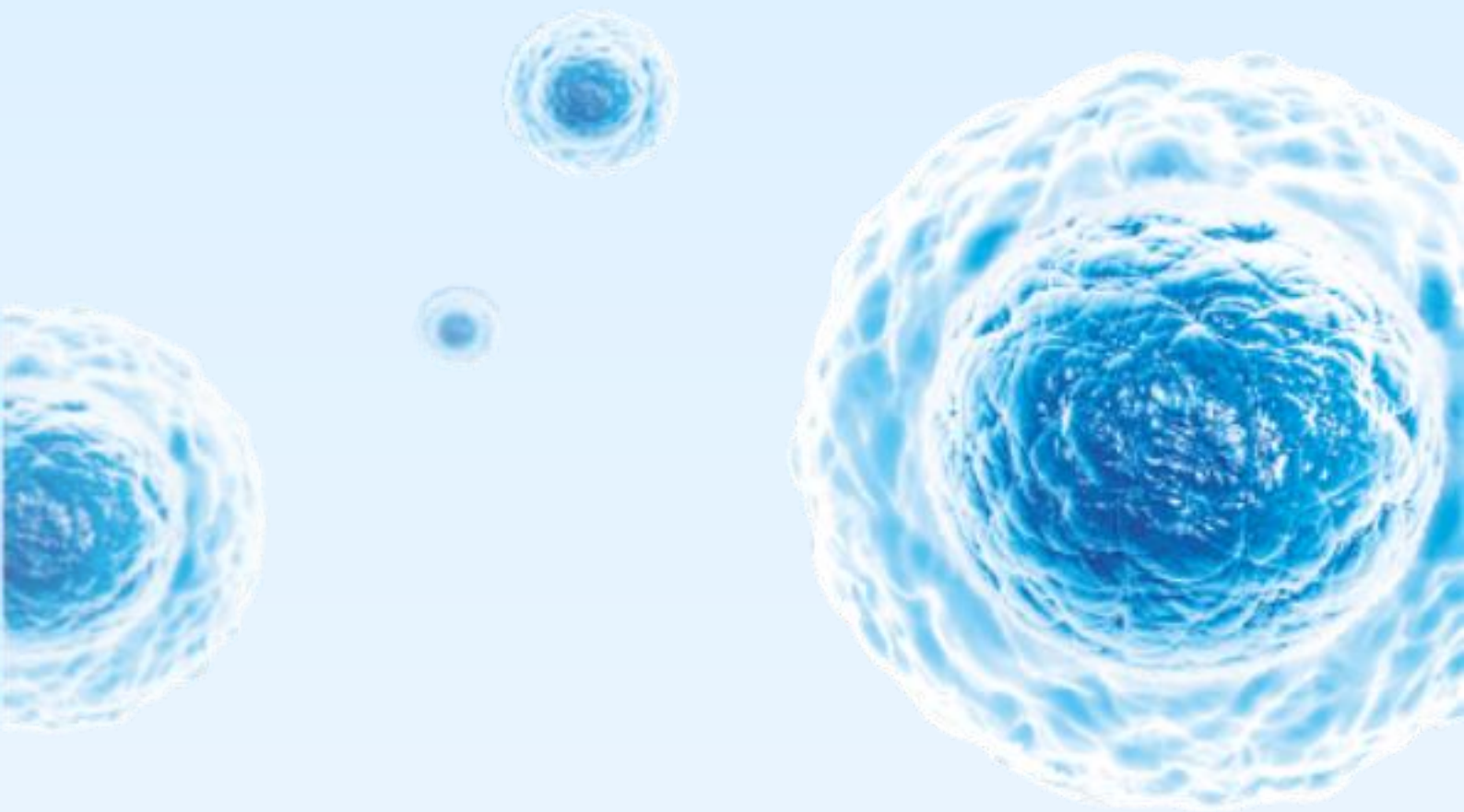




DynaSCOPE[®] Single Cell Dynamic RNA Library Kit (in vivo)

单细胞转录动态监测试剂盒 · 注射装

本手册适用于以下产品：

目录号	产品名称	规格
1189161	DynaSCOPE® Single Cell Dynamic RNA Library Kit (in vivo)	2 RXNs
1189162	DynaSCOPE® Single Cell Dynamic RNA Library Kit (in vivo)	16 RXNs

历史版本信息

版本信息	修改内容
2021/11	初版
2022/07	增加了注射版本
2023/04	修改了碱基转换条件
2024/09	修改了 logo
2025/03	建库打断时间变更

版权说明

新格元生物科技有限公司保留所有解释权利。本手册所描述的所有产品和服务仅供科学研究使用，不可用于临床诊断。

目录

1. 基本信息	- 1 -
1.1 产品概述	- 1 -
1.2 产品组成	- 2 -
2. 自备仪器耗材试剂	- 5 -
3. 工作流程和操作时间	- 7 -
4. 实验准备	- 8 -
5. 注射代谢标记试剂	- 9 -
6. 单细胞悬液制备（实体组织）	- 10 -
6.1 解离实验前准备	- 10 -
6.2 组织解离	- 10 -
6.3 细胞过滤	- 11 -
6.4 红细胞裂解及悬液质检	- 12 -
7. 细胞分离和 mRNA 捕获	- 13 -
7.1 微流控芯片准备	- 13 -
7.2 Barcode Beads 准备	- 14 -
7.3 Lysis Mix 准备	- 15 -
7.4 单细胞悬液制备	- 15 -
7.5 单细胞分离	- 16 -
7.6 注入 Barcode Beads	- 16 -
7.7 细胞裂解和 mRNA 捕获	- 17 -

7.8 取出 Barcode Beads	- 18 -
7.9 碱基转换	- 19 -
8. 反转录及 cDNA 合成	- 21 -
8.1 反转录	- 21 -
8.2 cDNA 扩增	- 22 -
8.3 cDNA 纯化	- 24 -
8.4 cDNA QC	- 25 -
9. 文库制备	- 27 -
9.1 片段化	- 27 -
9.2 接头连接	- 28 -
9.3 接头连接后产物纯化	- 29 -
9.4 PCR 扩增	- 30 -
9.5 扩增产物片段分选	- 31 -
9.6 文库质检	- 32 -
附录 A 技术原理	- 35 -
附录 B 测序	- 39 -
附录 C 常见问题与解答	- 41 -

1. 基本信息

1.1 产品概述

DynaSCOPE®单细胞转录动态监测试剂盒可完成新生 RNA 代谢标记、单细胞分离、代谢标记至测序文库构建全部流程。

DynaSCOPE®单细胞转录动态监测试剂盒包括微流控微孔芯片，分子标签 Barcode Beads，代谢标记试剂，扩增试剂及文库构建试剂。本产品可高效无偏好性地完成 RNA 代谢标记、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中的 mRNA 进行测序。

使用 DynaSCOPE®海量单细胞转录动态监测试剂盒，在获得样本转录组信息的同时，还能在单细胞层面了解各类细胞转录活跃度信息。DynaSCOPE®海量单细胞转录动态监测试剂盒，能在丰富多维的单细胞转录组信息的基础上，添加时间的维度，实现高通量的 RNA 转录动态监测。可用于转录动力学研究，分化发育研究，病毒感染研究，药物作用研究等多领域。

SCOPE-chip 芯片是一种便携式微流控芯片，该芯片高效整合了单细胞转录组测序前处理的不同步骤，包括单细胞捕获、细胞裂解、分子标签标记、捕获细胞 RNA 等。其性能特征和优势如下：

1. 使用简便，可手动操作，无需特殊仪器。
2. 可用于单细胞分离后存储运输。
3. 适用于不同细胞类型，具有广谱性。



1.2 产品组成

以下适用于 DynaSCOPE® Single Cell Dynamic RNA Library Kit (in vivo) (2 RXNs)

Box 1: Single Cell RNA Amplification SD & Library Reagents Tissue

收到试剂盒后，请及时保存在-25~-15℃。

组分	数量	体积	管盖颜色
Lysis Buffer, Stock	1	1500μL	绿色
RNase Inhibitor	1	50μL	绿色
100 mM DTT	1	400μL	绿色
RT master Mix	1	400μL	紫色
Reverse Transcriptase	1	50μL	紫色
TS Primer	1	50μL	紫色
Amplification Master Mix	1	400μL	透明
A primer Mix	1	200μL	透明
Amplification Enzyme	1	20μL	透明
Fragmentation Buffer V3	1	17μL	橙色
Fragmentation Enzyme Mix V3	1	6μL	橙色
1× TE	1	800μL	橙色
Ligation Mix	1	72μL	蓝色
Ligation booster	1	4μL	蓝色
Adaptor	1	50μL	蓝色
Library Amp Mix V3	1	60μL	白色
Indexing Primer Mix1(ATCACGTT)	1	30 μL	白色
Indexing Primer Mix2(CGATGTTT)	1	30 μL	白色
Tissue Dissociation Mix	3	1800 μL	黄色
Tissue Preservation Solution	2	1800 μL	棕色

Box 2: SCOPE–chip SD & 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 SD 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 SD	2	–	–

Box 3: Dynamic Metabolic RNA labeling/S

收到试剂盒后，请及时保存在-25~-15℃。

组分	数量	体积	管盖颜色
Labeling reagent	1	120μL	棕色
Conversion reagent	2	50mg	棕色
Conversion buffer	1	6mL	-

以下适用于 DynaSCOPE® Single Cell Dynamic RNA Library Kit (in vivo) (16 RXNs)

Box 1: SCOPE-chip SD

收到试剂盒后，请及时保存在 2~35℃。

组分	数量
SCOPE-chip SD	16
Singleron Magnetic Rack	4

Box 2: Barcoding Beads SD

收到试剂盒后，请及时保存在 2~8℃。

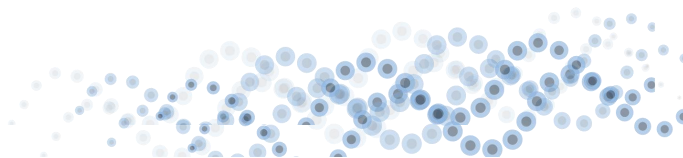
组分	数量	体积	管盖颜色
Barcode Beads SD V3	8	1.8 mL	黑色
Wash Buffer A	8	7 mL	白色
Wash Buffer B	6	1.8 mL	白色

Box 3: Single Cell Amplification Reagents SD

收到试剂盒后，请及时保存在-25~-15℃。

组分	数量	体积	管盖颜色
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	2	1500 μL	紫色
Reverse Transcriptase	1	400 μL	紫色
TS Primer	1	250 μL	紫色
Amplification Master Mix	2	1600 μL	透明
A Primer Mix	1	750 μL	透明
Amplification Enzyme	1	160 μL	透明

Box 4: Library Prep Reagents



收到试剂盒后，请及时保存在-25~-15℃。

组分	数量	体积	管盖颜色
Fragmentation Buffer V3	1	135 µL	橙色
Fragmentation Enzyme Mix V3	1	40 µL	橙色
1 × TE	1	800 µL	橙色
Ligation Mix	1	576 µL	蓝色
Ligation booster	1	20 µL	蓝色
Adaptor	1	50 µL	蓝色
Library Amp Mix V3	1	480 µL	白色

Box 5: Library Adapters

收到试剂盒后，请及时保存在-25~-15℃。

组分	数量	体积	管盖颜色
Indexing Primer Mix1 (ATCACGTT)	1	30 µL	白色
Indexing Primer Mix2 (CGATGTTT)	1	30 µL	白色
Indexing Primer Mix3 (TTAGGCAT)	1	30 µL	白色
Indexing Primer Mix4 (TGACCACT)	1	30 µL	白色
Indexing Primer Mix5 (ACAGTGGT)	1	30 µL	白色
Indexing Primer Mix6 (GCCAATGT)	1	30 µL	白色
Indexing Primer Mix7 (CAGATCTG)	1	30 µL	白色
Indexing Primer Mix8 (ACTTGATG)	1	30 µL	白色

Box 6: Dynamic Metabolic RNA labeling/L

收到试剂盒后，请及时保存在-25~-15℃。

组分	数量	体积	管盖颜色
Labeling reagent	8	120µL	棕色
Conversion reagent	16	50mg	棕色
Conversion buffer	4	6mL	-

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

通用仪器试剂耗材:

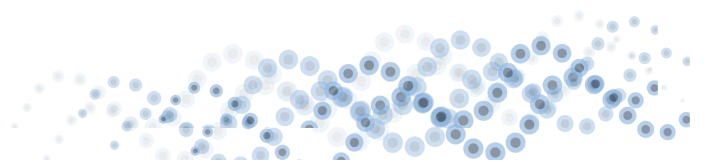
- 无水乙醇
- 无核酸酶水
- 1.5 mL 或 2 mL 无核酸低吸附离心管
- 15 mL 和 50 mL 锥形离心管
- 巴氏吸管
- 不同量程单通道移液器
- 不同规格无菌&无核酸酶吸头
- 小型离心机
- 涡旋混匀仪
- DynaMagTM-2 磁力架/12321D/Thermo 或其他兼容 1.5mL 离心管的磁力架
- 医用冷藏冷冻箱

样本制备和代谢标记环节

- 1×HBSS
- 0.4%台盼蓝染液
- 培养基 DMEM
- 胎牛血清
- 超净工作台
- 恒温细胞培养箱

单细胞悬液制备和芯片加载 (Pre-PCR)

- RNase Away 或其他同类产品
- 不同规格无菌&无核酸酶吸头
- 兼容 15 mL 和 50 mL 锥形离心管的高速冷冻离心机
- 倒置显微镜
- 血球计数板
- 1×PBS (不含 Ca^{2+} + Mg^{2+})



- 0.4% 台盼蓝染液
- 10 % Tween-20

cDNA 扩增和文库构建 (Post-PCR)

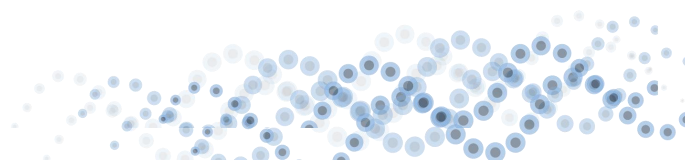
- 恒温振荡金属浴
- PCR 仪
- 全自动核酸片段分析仪，如 Agilent Fragment Analyzer 5200
- Qubit 4.0 荧光定量仪
- 0.6mL PCR 透明薄壁管 (Qubit 定量，推荐 Axygen)
- AMPure XP 纯化磁珠 (Beckman)
- 10mM Tris-HCl pH 8.5 或 Elution Buffer
- 0.2mL 无菌&无核酸酶八联排管或 PCR 管

注意: 试剂耗材必须是无菌、无核酸酶的。

3. 工作流程和操作时间

步骤	时间	终止&保存
注入代谢标记物	1h-5h	
组织解离	0.5-1h	
注入细胞		
注入 Barcode Beads	0.5-1h	Stop, $-80^{\circ}\text{C} \leq 48\text{h}$
mRNA 捕获		
碱基转换	1h	
反转录&扩增	2-3h	Stop, $4^{\circ}\text{C} \leq 72\text{h}$ or $-20^{\circ}\text{C} \leq 7\text{days}$
建库	3h	Stop, $-20^{\circ}\text{C} \leq 30\text{days}$
全流程时长	8-11h	

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”。这些步骤包括单细胞分离、RNA 标记和 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。

5. 注射代谢标记试剂

准备材料:

- Labeling reagent

自备材料:

- 1mL 注射器, 实验动物



注意: 本节均以模式动物小鼠为例进行注射说明。

1. 称取小鼠体重, 取小鼠体重的 1/100 为 Labeling reagent 的质量, 换算 Labeling reagent 剂量体积。例: 小鼠体重 30g, Labeling reagent 的量为 0.3g, 换算体积为 300uL。
2. 一只手抓取小鼠的尾巴, 将小鼠放在粗糙面上, 另一只手的大拇指和食指抓紧小鼠的双耳及耳间皮肤、中指和无名指将小鼠背部的皮肤压在同侧手掌上、小指压住小鼠的尾巴。
3. 将小鼠体位摆放为头低尾高位。其主要的依据是, 这样的体位摆放, 可以让小鼠游离度较大的肠道在重力的作用下向膈肌靠拢, 使得下腹部相对空虚, 便于腹腔直射给药。
4. 腹腔注 Labeling reagent, 针朝鼠头方向从下腹左侧或右侧刺入皮下之后, 往前推针 3~5mm, 改 45° 角刺入腹腔肌肉, 注意不要损伤小鼠内脏。刺破腹腔肌肉和膜后, 针头抵抗力消失, 略回拉针栓, 无回血和回尿, 即可注入 Labeling reagent。(也可选择尾静脉注射, 可使 Labeling reagent 迅速扩散到全身, 但对操作手法要求高, 失败率较高, 除非特殊情况【如标记时间小于 1h, 或其他生理、实验原因】, 否则不做首选注射方法。)

注意:

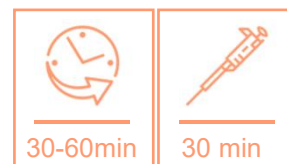
- ① 若需确定注射时间与 RNA 标记的比例关系, 建议设计梯度实验进行合适的标记时间探索。梯度取样时间间隔时间可初步设为 1h, 总标记时间建议: $1h < \text{总标记时间} < 6h$ (以腹腔注射为例), 不同器官合理标记时间以梯度实验时间为参考标准。
- ② 为保证一定量的新生 RNA 代谢比例, 代谢活跃的组织器官标记时间可选择 2h 为宜 (以腹腔注射为例), 代谢不活跃的器官建议延长代谢标记时间。若标记时间 $\geq 6h$, 建议每 3~4h 补一针同剂量的 Labeling reagent。

6. 单细胞悬液制备（实体组织）

准备材料：

- 组织解离液（Tissue Dissociation Mix）。

自备材料：



试剂	耗材	仪器设备
荧光细胞分析染料（AO/PI）	巴氏德吸管（5mL）	倒置相差显微镜
1X PBS	眼科剪/眼科镊	高速冷冻离心机
1X HBSS	无菌滤网（40μm）	恒温振荡摇床
红细胞裂解液	1.5mL 低吸附无菌离心管	荧光细胞计数仪
0.4%台盼蓝染液	15mL/50mL 低吸附离心管	血球计数板
无菌培养皿	不同量程单道移液器	

6.1 解离实验前准备

1. Tissue Dissociation Mix 恢复至室温，备用。
2. 将 PBS，HBSS 置于冰上预冷，备用。
3. 将恒温振荡摇床设置为 37 °C，180 rpm，预热。
4. 将眼科剪、眼科镊等解离相关器具灭菌备用。
5. 将细胞计数所用的台盼蓝染液、荧光染液分装备用。

6.2 组织解离

1. 标记时间结束，立即取对应的组织进行解离。注意，组织离体到步骤 7.细胞分离和 mRNA 捕获之间的间隔时间应尽量小于 4h（包括组织解离的时间，包括获得细胞悬液之后，做流式分选，或磁珠分选的时间（若有分选步骤）），期间除了必要步骤外（如组织解离），尽量将组织或细胞悬液保存在 4°C。目的是降低细胞代谢速率，防止被标记的 RNA 随着细胞的代谢降解掉。
2. 清洗称重：用眼科镊将新鲜组织转移至含有 HBSS 缓冲液的培养皿中，依次清洗 3 次，将组织转移至 1.5mL 低吸附离心管中，去皮、称重并记录重量。
3. 组织称重后向其中加入 200 μL 预冷的 SCellLiVe 组织解离液，用无菌眼科剪剪碎组织块至肉糜状，再加入 1mL SCellLiVe 组织解离液后用巴氏吸管将肉糜状的组织匀浆转移至

15 mL 低吸附离心管中，根据称量的组织重量适当补充 SCellLiVe 组织解离液。若组织为完整穿刺样本，可在剪碎后向 1.5 mL 低吸附离心管中加入 1 mL SCellLiVe 组织解离液进行组织解离；若组织为碎渣状的穿刺样本，可离心收集后再在 1.5 mL 低吸附离心管中消化解离。

注意: Tissue Dissociation Mix 使用量：100 mg 组织使用 2 mL Tissue Dissociation Mix。

4. 将 15 mL 低吸附离心管 45° ~180° 倾斜放入已预热的 37 °C 恒温振荡器，180 rpm，机械振荡，每隔 5min 观察 1 次细胞悬液，直至组织彻底消化。
5. 镜检时，取 10 μL 细胞悬液与台盼蓝染液按照体积比 1:1 混合染色，观察组织解离情况。若组织块消化完全，显微镜下观察细胞无成团或聚集现象且无杂质等，细胞悬液即为达标，可停止消化；若组织残余较多，细胞成团较严重，细胞悬液即为不达标，可继续追加消化 5–10 min，再次观察和判断细胞悬液是否达标。

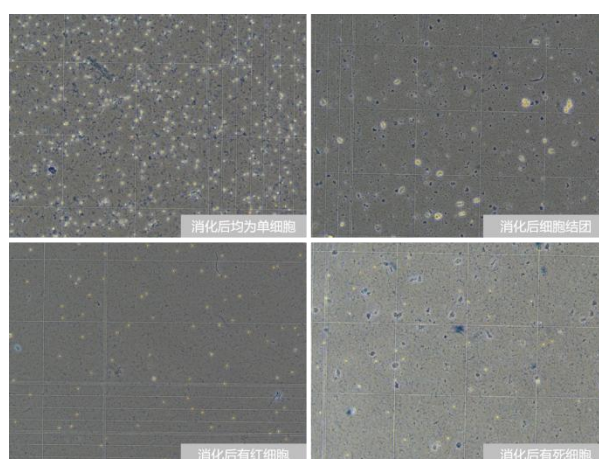


图 1：消化后均为单细胞；图 2：消化后细胞结团；图 3：消化后有红细胞；图 4：消化后有死细胞。

6.3 细胞过滤

1. 转移过滤：将解离达标的细胞悬液通过 40 μm 滤网过滤至 50 mL 低吸附离心管中，用 PBS 冲洗离心管管壁 1–2 次，保证将细胞全部转移，用 PBS 将过滤后的悬液体积定容至 15–25mL。
2. 离心重悬：将上步获得的细胞悬液离心，350 g，5 min；待离心结束后用巴氏吸管沿离心管壁小心吸除上清，直至上清体积剩余约 1 mL 时用剩余体积重悬细胞沉淀，上清液可暂存于离心管中。

3. 过滤镜检: 取 10 μL 细胞悬液与台盼蓝染液按照体积比 1:1 混合染色, 镜检观察细胞状态。

转移过滤: 将解离达标的细胞悬液通过 40 μm 滤网过滤至 50 mL 低吸附离心管中, 用 PBS 冲洗离心管管壁 1-2 次, 保证将细胞全部转移, 用 PBS 将过滤后的悬液体积定容至 15-25mL。

注意: 红细胞占比大于 20%, 需要进行红细胞裂解步骤。

6.4 红细胞裂解及悬液质检

1. 将 6.3 中的细胞悬液转移至 15 mL 或 50 mL 低吸附离心管中, 细胞悬液和红细胞裂解液体积比为 1: 2 定容, 混匀后将离心管温和地上下颠倒混匀, 冰上反应 5-8 min 后离心, 300 g, 5 min。用巴氏吸管吸除上清, 上清尽量吸除干净, 上清可暂存于离心管中。若红细胞占比大于 80%, 可考虑分管裂红处理或按照体积比 1:3 定容。裂红离心后用巴氏吸管和移液器尽量吸除上清。
2. 重悬: 用 1 mL 预冷的 PBS 缓冲液重悬细胞沉淀, 镜检, 判断红细胞是否裂解彻底。
3. 洗涤: 若无需进行二次裂红处理, 可用预冷的 PBS 缓冲液将细胞悬液定容至 10 mL, 将离心管温和地上下颠倒混匀后离心, 300 g, 5 min, 吸除上清。
4. 计数: 根据步骤 2 镜检观察的细胞量, 用适当体积的 PBS 重悬细胞沉淀, 取 10 μL 细胞悬液进行荧光染色或台盼蓝染色, 用荧光计数仪或计数板计算细胞浓度及活性。

质控等级	评判标准	对应处理
合格	细胞活性>85%, 细胞总数>20000, 杂质或红细胞占比小于 20%;	进行下一步实验
风险	细胞活性 70%-85%, 细胞总数>20000, 杂质或红细胞占比大于 20%;	可尝试风险进行下一步实验
不合格	细胞活性<70%, 细胞总数<20000, 红细胞或杂质占比>90%。	终止实验

7. 细胞分离和 mRNA 捕获

7.1 微流控芯片准备

准备材料:

- SCOPE-chip SD。

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. 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

2. 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℃ 过夜保存。

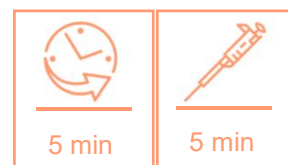
7.2 Barcode Beads 准备

准备材料:

- Barcode Beads（黑色）。

自备材料:

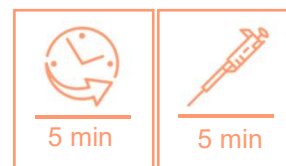
- DynaMag™-2 磁力架/12321D/Thermo 或其他兼容 1.5mL 离心管的磁力架
 - PBS
1. 清洗 Barcode Beads：将 Barcode Beads 用移液器（1mL 量程）轻柔吹打 15 次混匀后，吸取 900 μ L Barcode Beads（1RXN）于 1.5 mL 离心管中，短暂离心后置于 1.5mL 规格磁力架（DynaMag™-2 磁力架/12321D/Thermo，本小节磁力架同规格）上，静置 1min，待溶液澄清后，小心移除上清。清洗时需将离心管从磁力架上取下，加入 1mL PBS，瞬离后置于磁力架上，静置 1min，待溶液澄清后，小心移除上清，清洗 3 次即可；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℃ 冰箱待用。



7.3 Lysis Mix 准备

准备材料:

- 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:

组分	1 RXN (μL) ×1	2 RXNs (μL) ×2.2
Lysis Buffer, Stock	92.5	203.5
100mM DTT	5	11
RNase Inhibitor	2.5	5.5
Total	100	220

7.4 单细胞悬液制备

准备材料:

- 细胞悬浮液 (来源于步骤 6.4)



自备材料:

- PBS
- 血球计数板
- 倒置显微镜

用 PBS 将处理好的细胞悬液稀释至 $1.0 \times 10^5 - 4.0 \times 10^5$ cells/mL，即可用于芯片实验。

目标细胞捕获数	推荐的细胞悬液浓度
6000–9000	$(1.5 - 2.0) \times 10^5$ cells/mL
9000–12000	$(2.0 - 2.5) \times 10^5$ cells/mL
12000–15000	$(2.5 - 3.0) \times 10^5$ 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 100 μL 的 2.5×10^5 细胞/mL 悬液(右列)(25000 个细胞)来加

载 SCOPE-chip。

7.5 单细胞分离

准备材料:

- 预处理好的 SCOPE-chip SD (见 7.1 微流控芯片准备)
- 稀释好的细胞悬液 (见 7.4 细胞悬液准备)

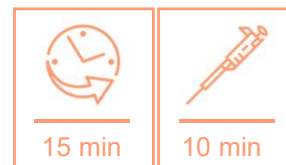
自备材料:

- 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 100 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。
4. 待细胞落入微孔内, 吸取 200 μ L PBS 缓慢匀速 (约 30s) 注入芯片冲洗掉多余细胞, 立即移除出样口液体。
5. 重复 1 次步骤 4, 冲洗掉留在表面未落入微孔内的细胞。
6. 在显微镜下观察芯片通道内表面黏附的多余细胞是否去除干净, 若还有残留, 可继续加 PBS 冲洗 (冲洗时应缓慢匀速, 避免气泡引入)。
7. (选做) 在显微镜下拍照计数各视野的细胞数, 记录数据。



7.6 注入 Barcode Beads

准备材料:

- 上一个步骤中包含细胞的 SCOPE-chip SD
- 预处理后的 Barcode Beads (见 7.2 Barcode Beads 准备)



自备材料:

- PBS
 - 200 μ L 移液器吸头
1. 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。
 2. 多次吸取 100 μ L PBS, 缓慢匀速 (约 30s) 加入进样口, 使 Barcode Beads 缓慢流动, 及时吸取出样口 Barcode Beads, 直至达到芯片的另一端, 在此期间收集出样口的多余 Barcode Beads。
 3. 吸取 200 μ L PBS 缓慢匀速注入芯片 (约 30s)。
 4. 从出样口收集多余 Barcode Beads 置于新 1.5 mL 离心管中(收集时不与出样口端接触)。
 5. 重复 2 次步骤 3, 以去除多余 Barcode Beads。

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。

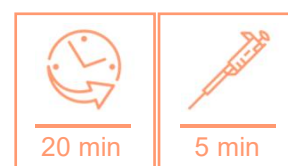
6. 在显微镜下观察多余 Barcode Beads 是否去除干净, 若还有残留, 继续加 PBS 冲洗。

7.7 细胞裂解和 mRNA 捕获**准备材料:**

- 上一个步骤中包含细胞和磁珠的 SCOPE-chip SD
- 配好的 Lysis Mix (见 7.3 Lysis Mix 准备)

自备材料:

- 200 μ L 移液器吸头



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. 吸取 100 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。

7.8 取出 Barcode Beads

准备材料:

- 上一步骤中的 SCOPE-chip SD
- 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。

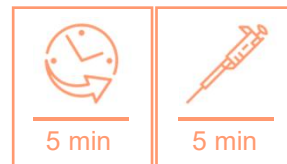


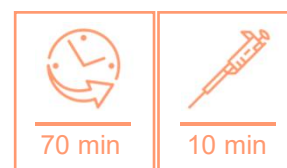
图 3 Barcode Beads 取出示意图

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。

7.9 碱基转换

准备材料:

- 上一步骤捕获了 mRNA 的 Barcode Beads;
- Conversion reagent (棕色);
- Conversion buffer;
- Wash Buffer A。



自备材料:

- 200 μL 移液器吸头
- DMSO (二甲基亚砜);
- 振荡涡旋仪;
- 1.5mL 离心管;
- DynaMag™-2 磁力架

4. 体系配制: 提前将一管 Conversion reagent 取出, $10000 \times g$ 离心 1min, 小心打开盖子, 加入 670 μL Conversion buffer, 盖上盖子涡旋混匀 2min, 使其充分溶解。溶解完毕, 瞬时离心后, 取 20 μL Conversion reagent, 用 460 μL Conversion buffer 稀释 24 倍备用。

注意: Conversion reagent 为一次性使用, 未用完的请妥善处理, 不可再次使用。下次实验需溶解一管新的 conversion reagent。当天的实验若有多个样本, 可用同一管 conversion reagent。

5. 按照下表配制 Conversion Mix, 涡旋 10s 混匀并瞬离。(配置好的 Conversion Mix 需放在冰上预冷 5 分钟, 若出现浑浊或者沉淀, 不影响碱基转化)

Conversion Mix:

组分	1 RXN (μL) $\times 1$	2 RXNs (μL) $\times 2.2$
稀释后的 Conversion reagent	150	330
DMSO (二甲基亚砜)	350	770
Total	500	1100

6. 将步骤 6.7 装有 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，小心移除上清。
7. 从磁力架上取下离心管并放置在冰上，加入 1mL 预冷的 Wash Buffer A，用 1mL 移液器轻轻吹吸 5 下混匀后短暂离心，置于磁力架上，待溶液澄清后小心移除上清。
8. 将离心管从磁力架上取下来，放冰上预冷 1min，随后立即将 400μL 预冷 5min 后的 Conversion mix 加入到上述预冷的离心管中，一边吹打混匀，一边分装到八联排管中（冰上操作），每管分装液体体积为 50μL。（注：尽量分完所有液体，避免磁珠损失）。
9. PCR 仪器转换程序如下表。PCR 仪的盖子温度应设置为 25℃。

转换程序：

Lid Temperature 25℃		Reaction Volume 50μL	
步骤	温度	时间	
1	4℃	1 min	
2	15℃	58 min	
3	4℃	Hold	

10. 将标记好的 PCR 八联排管放置在 PCR 仪中，并运行转换程序。

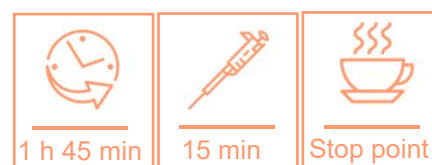
注意：在运行转换步骤之前，磁珠及 Conversion Mix 应始终放置在冰上。

8. 反转录及 cDNA 合成

8.1 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);
- 上一步骤经过碱基转换的 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	120	264
Cold nuclease-free water	45	99
TS Primer	10	22
RNase Inhibitor	5	11
Reverse Transcriptase	20	44
Total	200	440

2. 从 PCR 仪中取出 PCR 八联排管，并将其放置在冰上（不要在室温中放置）。向其中加入经预冷的 100 μ L Wash Buffer A。短暂离心后置于 1.5mL 规格磁力架上，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 500 μ L 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 20 μ L 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 200 μ L 好的 RT Mix，并吹打混匀。
6. 置于提前设置好的金属浴中，42 $^{\circ}$ C，转速 1300 rpm，反应 90min（提前预热）。

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

8.2 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 $^{\circ}$ C。

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

组分	1 RXN (μL) ×1	2 RXNs (μL) ×2.2
Amplification Master Mix	172	378.4
A Primer Mix	32	70.4
Cold nuclease-free water	188	413.6
Amplification Enzyme	8	17.6
Total	400	880

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 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。

8.3 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 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 $0.6 \times 400 = 240\mu$ 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。

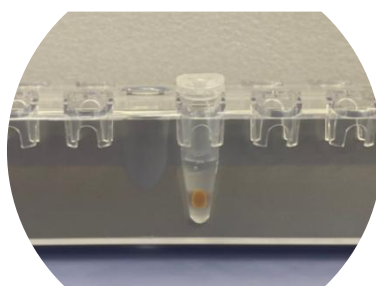


图 4 AMPure Beads 在磁力架上吸附示意图

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。

8.4 cDNA QC

准备材料:

- 上一步纯化好的 cDNA (来源于步骤 8.3)

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 5)。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 100 μ L, 然后按下表的磁珠比例进行二次纯化。二次纯化后满足步骤 2 的“合格”要求仍可直接建库。

40-300 bp 片段占比	纯化磁珠比例
10% - 20%	0.8 x
21% - 35%	0.7 x
> 35%	0.6 x

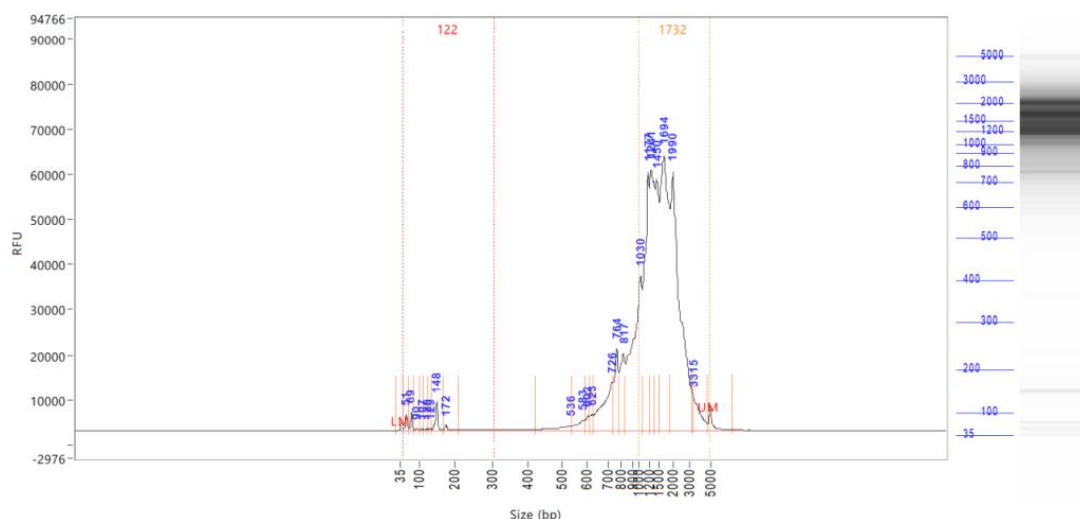


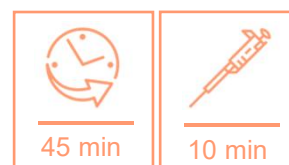
图 5 符合质控标准的 cDNA 片段的质控展示图

9. 文库制备

9.1 片段化

准备材料:

- Fragmentation Buffer V3 (橙色) ;
- Fragmentation Enzyme Mix V3 (橙色) ;
- 1×TE (橙色) ;
- 步骤 8.4 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℃		反应体积: 35μL
步骤	温度	时间
1	37℃	10 min
2	65℃	30 min
3	4℃	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 × 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。

9.2 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 9.1)

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

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。

3. 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)。

4. 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。

9.3 接头连接后产物纯化

准备材料:

- 步骤 9.2 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 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。

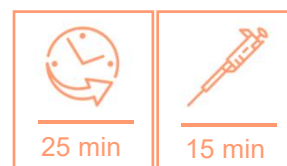
1. 每个反应准备 0.5mL 80%乙醇和 25μL 0.1 X TE 溶液（将 1 X TE 与无核酸酶水以 1:10 稀释）。
2. 将产物 PCR 管短暂离心，用移液器测量体积，加入 AMPure XP 纯化磁珠体积为 PCR 扩增产物总体积的 0.2x(例如：片段化产物体积为 68.5 μL，则应使用 $0.2 \times 68.5 = 13.7 \mu\text{L}$ AMPure XP 纯化磁珠)。涡旋 15s 混匀后，室温孵育 5min。
3. 将 PCR 管短暂离心后置于 0.2mL 规格磁力架（磁力架/TND08-C-A/深圳拓能达，本小节磁力架同规格）上，使纯化磁珠与液体分离，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 200μL 新鲜配制的 80%乙醇漂洗磁珠，室温孵育 30s，小心移除上清。
5. 重复步骤 4，总计漂洗 2 次。
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 17μL 0.1 × 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 15μL 上清至新的灭菌 PCR 管中用于步骤 9.4 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。

9.4 PCR 扩增

准备材料：

- Library Amp Mix V3（白色）；
 - Indexing Primer Mix（白色）；
 - 步骤 9.3 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 9.3 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

9.5 扩增产物片段分选

准备材料:

- 步骤 9.4 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：

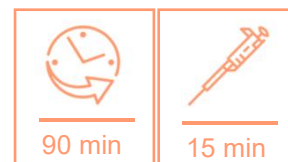
- AMPure XP 纯化磁珠(以下简称磁珠)提前 30min 从 4℃ 中取出,恢复室温备用。
- 磁珠使用前需充分涡旋 15s 振荡混匀。
- 磁珠比较粘稠,应确保精确量取,缓慢加入,否则可能导致分选的片段长度与预期不一致。
- 离心管放置到磁力架上后不应再旋转,因此摆放时需确定离心管开盖方向,离心时,离心管开盖方向朝内放置。

1. 每个反应准备 0.5mL 80%乙醇。将产物 PCR 管短暂离心,用移液器测量体积,并用 NF 水补齐至 50μL。取 25μL 磁珠加入到 PCR 产物中,涡旋混匀,室温孵育 5min。
2. 将 PCR 管短暂离心后置于 0.2mL 规格磁力架(磁力架/TND08-C-A/深圳拓能达,本小节磁力架同规格)上静置,使纯化磁珠与液体分离,待溶液澄清后(约 5min),小心回收上清液至一个新的无菌 PCR 管中,丢弃纯化磁珠。
3. 涡旋振荡混匀磁珠并吸取 7.5μL 加入至上清中,涡旋振荡充分混匀,室温孵育 5min。
4. 将 PCR 管短暂离心后置于磁力架上,使纯化磁珠与液体分离,待溶液澄清后(约 5min),小心转移上清液置于新的 PCR 管暂时留存。
5. 保持 PCR 管始终处于磁力架上,加入 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。

9.6 文库质检

准备材料：

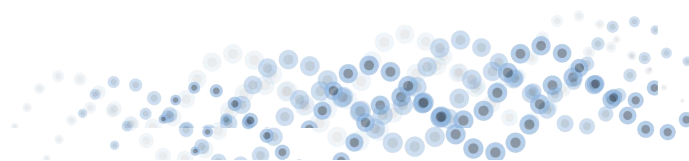


- 步骤 8.5 的纯化产物。

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. 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	满足以下任意一条: Qubit 值<50ng, 主峰 <400bp, 225bp-500bp 占比<30%	不建议上机测序



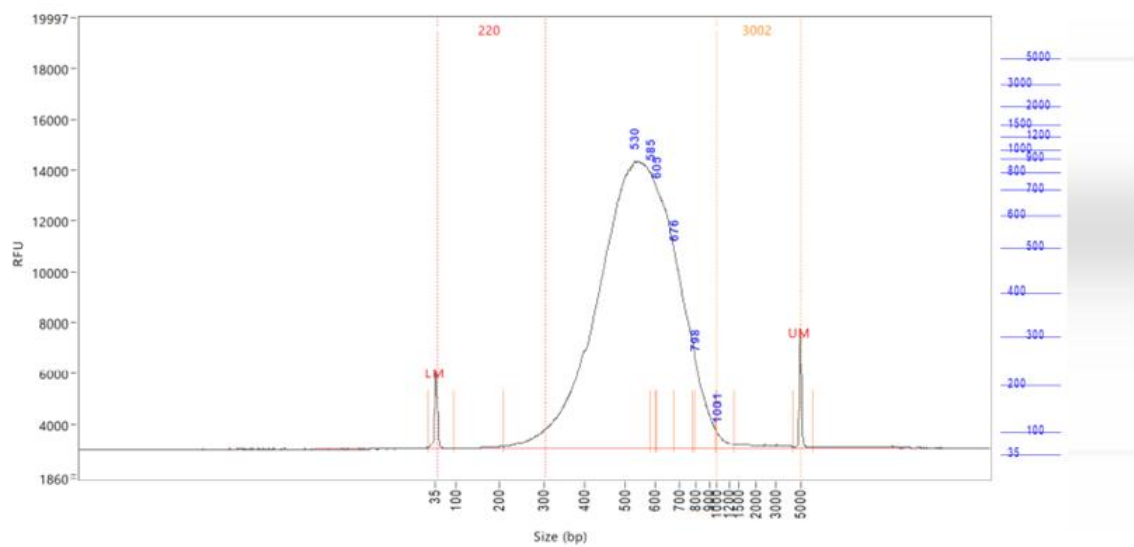


图6 文库质检图

附录 A 技术原理

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 Beads。细胞裂解后，带有独特细胞标签（Barcode）及分子标签（UMI）的 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。

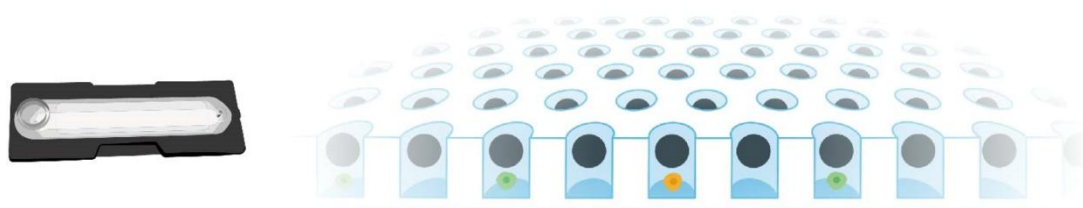


图 A1: SCOPE-chip 微流控芯片外形（左）及细微结构（右）

RNA 代谢标记原理

新生 RNA 代谢标记是通过将尿嘧啶类似物(S4U)注射入模式动物体内（以小鼠为例）进行短时间的体内代谢，随着细胞的新陈代谢，在细胞内新合成的 RNA 分子中尿嘧啶类似物(S4U)不断的替代 RNA 中尿嘧啶（U）分子，而已经存在的 RNA 分子中不存在尿嘧啶类似物。

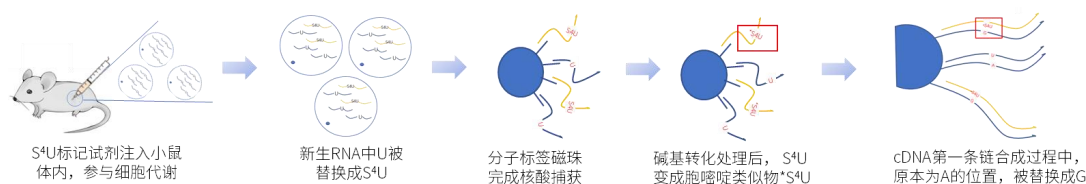


图 A2: 代谢标记原理图

单细胞分选、mRNA 捕获原理

通过进样口将一定数量的细胞注入到 SCOPE-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 Single Cell Barcode Beads 完成单个细胞的 mRNA 的捕获和标记。Barcode 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。

碱基转换和反转录原理

mRNA 被捕获后，利用化学试剂诱导碱基转换，使尿嘧啶（U）的类似物变成胞嘧啶（C）的类似物。反转录时，cDNA 中原本应该为碱基 A 的位置被错配成为 G。

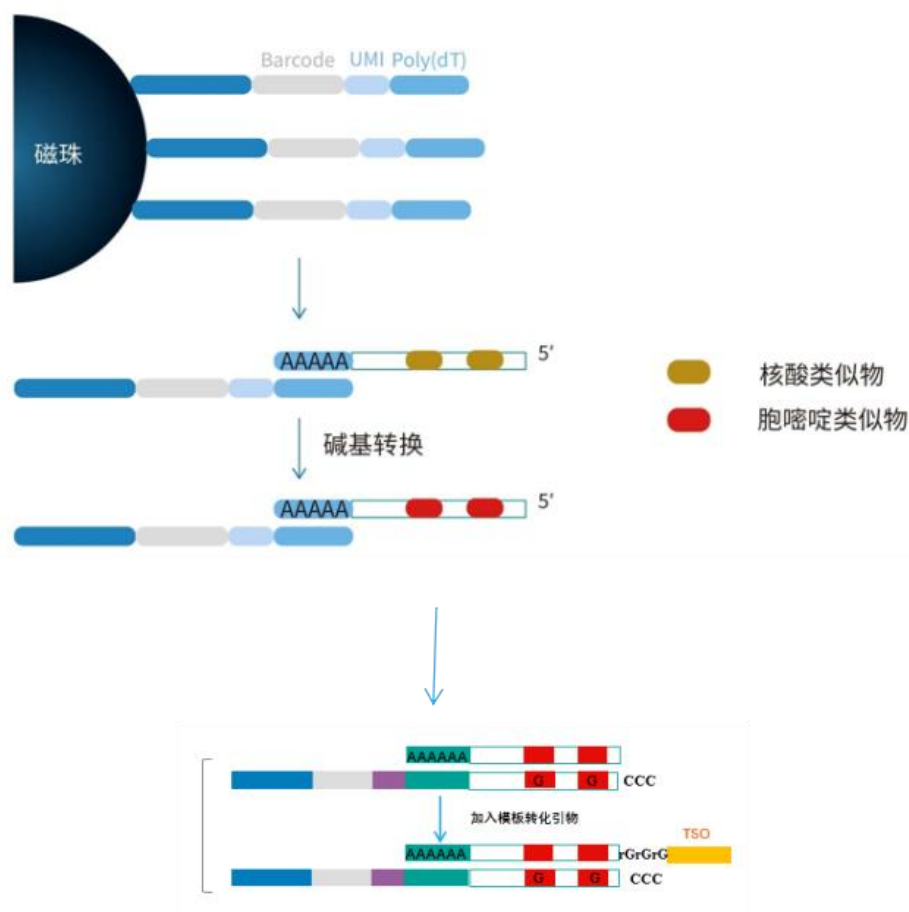


图 A3：碱基转换及反转录原理图

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

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。

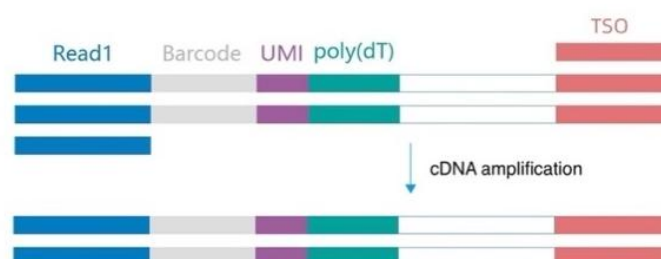


图 A3: cDNA 富集扩增原理图

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。

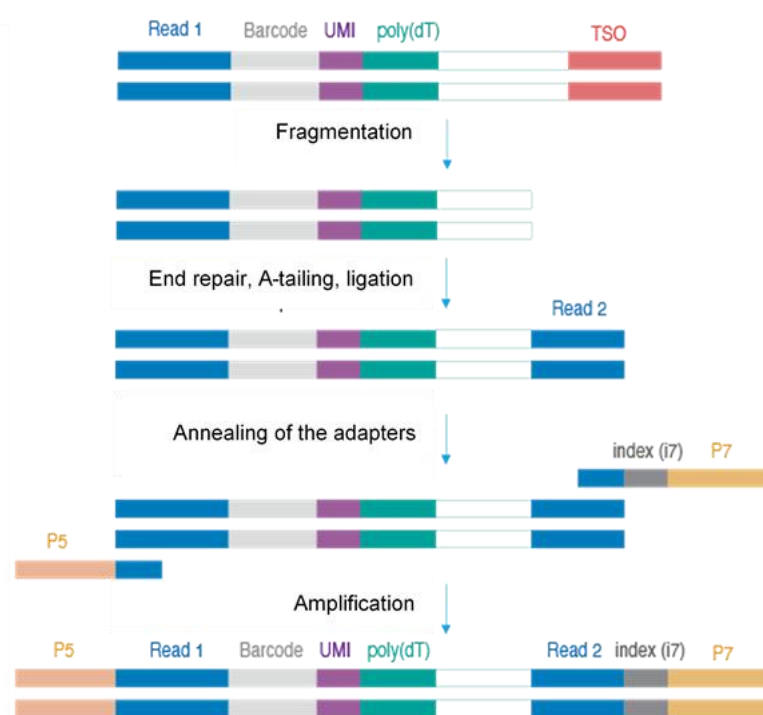


图 A4: 转录组文库构建原理图

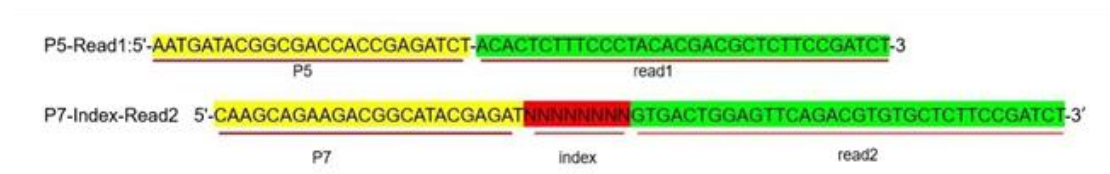


图 A5: 转录组 illumina 文库结构图 (左右两侧序列)

附录 B 测序

测序文库

GEXSCOPE®单细胞 RNA 文库试剂盒产生标准的 Illumina 单端测序文库，以 P5 开始，以 P7 结束。通过“Read1”测序引物定位 60 碱基条形码(27 个碱基的独特序列加上间隔序列)。文库包含了一个 8 碱基的 i7 index 序列(参见 1.2 产品组成)。P5 和 P7 是桥式扩增时使用的标准 Illumina 测序序列。

进行双端测序，其中 read1 用于解析 60 碱基条形码和 12 碱基 UMI，而 read2 用于获得基因特异性序列。标准 Illumina FASTQ 文件是通过对这些文库进行测序而产生的。



图 B: 测序文库结构

测序仪

Singleron Biotechnologies 验证了下面列出的测序仪的兼容性。测序仪的选择会影响检测性能。有关测序的更多信息，请访问 Singleron 生物技术支持网站。

- HiSeq X Series
- NovaSeq 6000
- NovaSeq X

测序深度和运行参数

测序深度

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

测序模式

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

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

[#]对于 read2, 至少测 100bp 以上, 以确保参考基因组比对的准确性, 建议测 150bp。

附录 C 常见问题与解答

1. DynaSCOPE®适配的样本类型？

答：DynaSCOPE®培养版试剂盒适用于细胞活性较高的组织、肿瘤组织、免疫细胞、骨髓、睾丸、肺、细胞系、PBMC 等。通常来说，脑、小肠、肝、肾、脾脏、胰腺等器官在单细胞解离后容易死亡，培养过程中细胞活性下降明显。对于不确定的样本，建议送样前做预实验，自行尝试将非正式实验的同类型组织解离成单细胞，然后在细胞培养基中培养（可自定义培养基），每隔 30min 测定细胞活性。培养 1h 后，若细胞活性低于 80%，或比初始活性降低 10%以上，则表明该样本不适用于 DynaSCOPE®培养版试剂盒。

DynaSCOPE®注射版试剂盒适用于模式动物，如小鼠、大鼠。标记物注射到动物体内后，可标记全身所有组织（包括脑和胚胎），因此只要组织解离后，能满足上样要求，均适用 DynaSCOPE®注射版试剂盒。

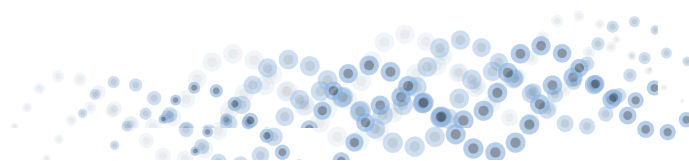
另外，不管是培养版试剂盒还是注射版试剂盒，均适用于细胞核测序，具体操作为：在 RNA 标记完毕后，将细胞/组织保存于液氮或-80℃，而后提取细胞核进行后续实验（或新鲜组织直接提取细胞核进行后续实验）。

2. 注射版和培养版试剂盒应如何选择？

答：较小的模式动物的实验（如小鼠、大鼠等），建议选择注射版，更能反应出细胞在正常生理状态下的转录动态。对于细胞系、类器官、人源样本、中大型实验动物样本、体外培养的原代细胞、干细胞，则选择培养版试剂盒。

3. 细胞标记时间如何选择？

答：培养版的培养时间通常在 0.5~6h，推荐为 2~4h。延长培养时间可以提高新生 RNA 比例，对一些转录不活跃的基因的新生 RNA 有更好的检出，但同时也会降低细胞活性，造成质控不合格，或数据质量差。建议每隔 1h 测一次细胞活性，如果细胞活性比初始未培养时降低 10%以上，马上终止培养，直接进入下一步。若培养时间超过 3h，建议每 3h 更换一次培养基和 labeling reagent。通常来说，脑、小肠、肝、肾、脾脏、胰腺等器官在单细胞解离后容易死亡，培养过程



中细胞活性下降明显。肿瘤细胞、免疫细胞、骨髓、睾丸、肺等解离成单细胞之后再进行培养，细胞活性下降相对较慢。

注射版注射标记物时间通常在 1~8h。延长标记时间可以适当提高新生 RNA 标记比例，为了一些转录不活跃的组织中新生 RNA 有更好的检出，可适当延长标记时间。建议设置动态转录注射新生 RNA 比例梯度实验，梯度间隔时间建议设置为 1h。通常来说，肿瘤、骨髓、肺、免疫细胞的 RNA 转录较活跃，标记时间可选择 1~4h；脑、小肠、肝、肾、睾丸等器官 RNA 转录不够活跃，建议 4~8h 或更长。若标记超过 4h，建议 4h 的时候补一针 labeling reagent (动物体重的 1%)。

4. 如何配制用于代谢标记推荐的培养基？

答：推荐使用 DMEM 培养基（无双抗+20%FBS），配制体系如下：

组分	体积 (mL)
培养基 DMEM	4
胎牛血清	1
Total	5

或者经过测试的其他有助于保持细胞活性的培养基。

5. 用于代谢标记的细胞数量选择多少？

答：推荐用于代谢标记的细胞总量为 $0.5 \sim 2 \times 10^6$ 细胞。

6. 代谢标记培养对细胞活性是否有影响？

答：由于细胞类型不同，部分细胞在培养后会出现活性降低 5%–10% 的情况，若细胞活性高于 80%，对后续实验影响不大。

7. 代谢标记培养后细胞活性质控？

答：细胞活性 > 80%，细胞总数 $> 4 \times 10^4$ 。

8. 单细胞转录动态监测需要做对照实验吗？

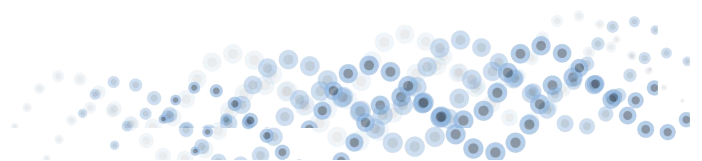
答：需要做一个对照，即同一个样本做一份单细胞转录动态（组织解离后，经过细胞培养/RNA 标记，再做单细胞转录动态），同时做一份普通单细胞转录组的对照（同一皿标记的细胞，直接做普通转录组）。对照可以作为 reference 精确判定测试组的新旧 RNA 比例。若仅供 reference 使用，可做 bulk RNA 测序当对照；若想了解常规转录组的其他信息，或者有其他分析需求，则需做一个单细胞层面的转录动态。

9. 单细胞转录动态测序的送样标准和质控与普通单细胞转录组测序有何不同？

答：普通单细胞转录组样本在我司组织保存液中保存 72h 内完成单细胞分离操作，单细胞转录动态样本则是 48h 内。单细胞转录动态对细胞活性和细胞数都要求更高。另外，单细胞转录动态不接收冻存样本。

10. 单细胞转录动态监测样本建议的测序量？

答：对照组建议平均每个细胞测 10000~15000 reads（1 万细胞测 PE150 约 30~45G），转录动态组建议平均每个细胞测 40000~60000 reads 或更高（1 万细胞测 PE150 约 120~180G，细胞数有变化则按比例换算）。



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）