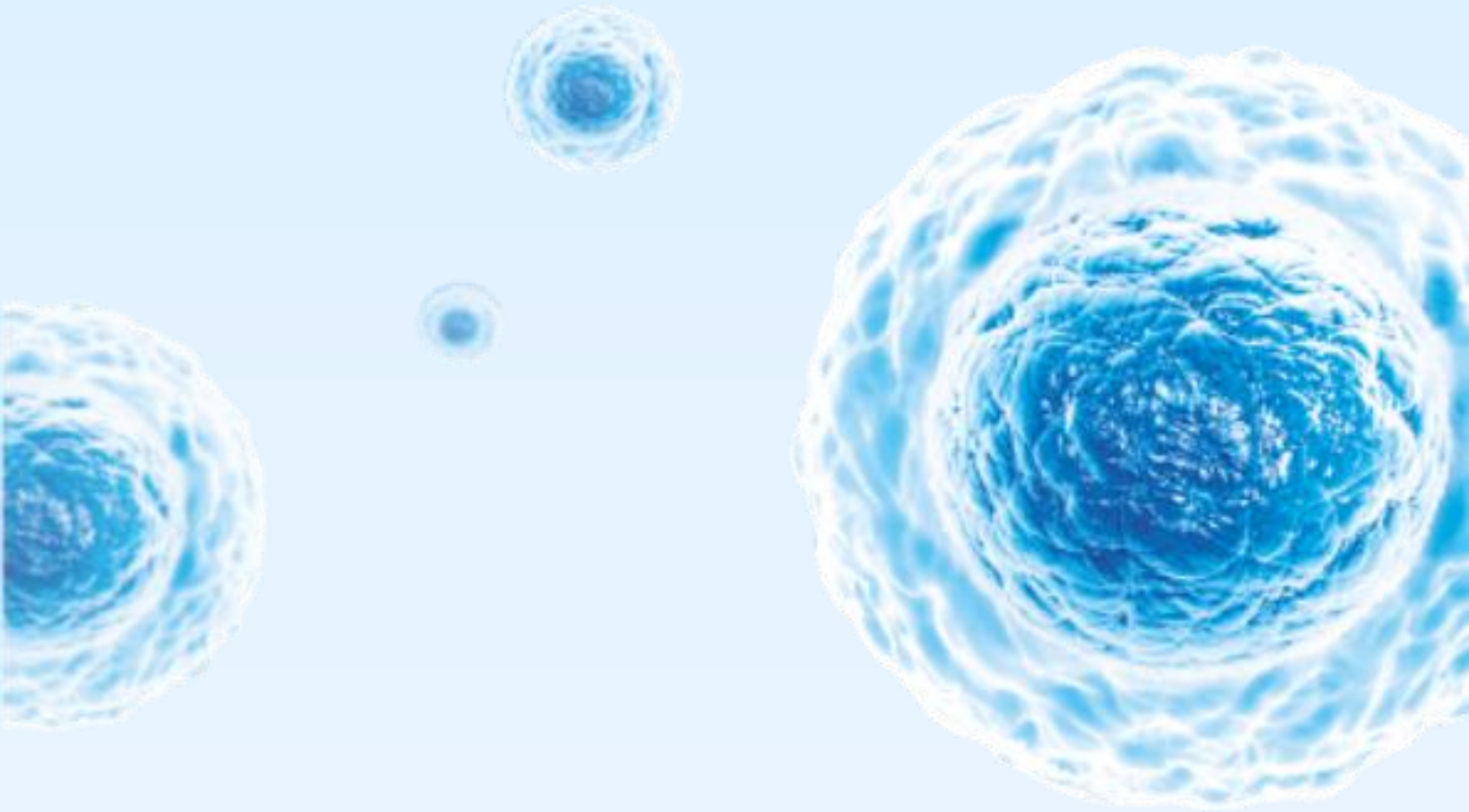
Singleron
新格元生物科技



ProMoSCOPE®Single Cell Glycosylation Detection Kit Tissue

高通量单细胞糖基化检测试剂盒

RUO 仅供科学研究使用

2025.04

本手册适用于以下产品：

目录号	产品名称	规格
1251011	ProMoSCOPE® Single Cell Glycosylation Detection Kit Tissue	2 RXNs
1251012	ProMoSCOPE® Single Cell Glycosylation Detection Kit Tissue	16 RXNs

历史版本信息

版本信息	修改内容
2022/07	初版
2024/09	标记方法更新
2025/03	Logo 和建库打断时间更新

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 ..... - 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 -

5.单细胞悬液制备（实体组织） ..... - 10 -

5.1 解离实验前准备 ..... - 10 -

5.2 组织解离 ..... - 10 -

5.3 细胞过滤 ..... - 11 -

5.4 红细胞裂解及悬液质检 ..... - 12 -

6. 细胞标记、分离和 mRNA 捕获 ..... - 13 -

6.1 细胞标记 ..... - 13 -

6.2 微流控芯片准备 ..... - 14 -

6.3 Barcode Beads 准备 ..... - 15 -

6.4 Lysis Mix 准备 ..... - 16 -

6.5 单细胞悬液制备 ..... - 16 -

6.6 单细胞分离 ..... - 17 -

6.7 注入 Barcode Beads ..... - 18 -

6.8 细胞裂解和 mRNA 捕获 ..... - 19 -

6.9 取出 Barcode Beads ..... - 19 -

7. 反转录及 cDNA 合成 ..... - 21 -

7.1 反转录 ..... - 21 -

7.2 cDNA 扩增 ..... - 22 -

7.3 cDNA 纯化 ..... - 24 -

7.4 cDNA QC ..... - 25 -

8. 转录组文库制备 ..... - 27 -

8.1 片段化 ..... - 27 -

8.2 接头连接 ..... - 28 -

8.3 接头连接后产物纯化 ..... - 29 -

8.4 PCR 扩增 ..... - 30 -

8.5 扩增产物片段分选 ..... - 31 -

8.6 文库质检 ..... - 32 -

9. 糖基化富集文库制备 ..... - 34 -

9.1 糖基化标签产物纯化 ..... - 34 -

9.2 糖基化标签富集 ..... - 35 -

9.3 糖基化富集文库纯化 ..... - 36 -

9.4 糖基化富集文库质检 ..... - 37 -

附录 A 技术原理 ..... - 38 -

附录 B 测序 ..... - 41 -

1. 基本信息

1.1 产品概述

ProMoSCOPE® 高通量单细胞糖基化检测试剂盒产品包括单细胞分选至单细胞转录组和糖基化标签捕获及糖基化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、糖基化富集文库构建。ProMoSCOPE® 高通量单细胞糖基化检测试剂盒，是在单细胞分辨率下同时检测单细胞转录组和细胞表面糖基化的商业化产品。基于酶促糖基化原理，在测序前经过糖基转移酶连接 Tag，使用 Singleron Barcode Beads 可完成对单细胞 Tag 标签及转录组的捕获，通过对标签文库及转录组的联合分析，可获得细胞转录组信息及细胞糖基化信息。

1.2 产品组成

以下适用于 ProMoSCOPE® Single Cell Glycosylation Detection Kit Tissue（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 Mix 1	1	30μL	白色
Indexing Primer Mix 2	1	30μL	白色
Tissue Dissociation Mix	3	1.8mL	黄色
Tissue Preservation Solution	2	1.8mL	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：Single Cell Glycosylation Detection Kit/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
ProMoSCOPE buffer	1	100μL	红色
ProMoSCOPE Primer 1	1	100ul	透明
PMT Conjugator	1	8 μL	红色
ProMoSCOPE tag	1	50 μL	棕色
PMT Enhancer	1	120 μL	红色
HiFi PCR PreMix	1	75 μL	绿色
ProMoSCOPE Indexing Mix 1	1	30 μL	白色
ProMoSCOPE Indexing Mix 2	1	30 μL	白色

以下适用于 ProMoSCOPE® Single Cell Glycosylation Detection Kit Tissue(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：Tissue Preservation & Dissociation 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
Tissue Preservation Solution	16	1.8mL	棕色
Tissue Dissociation Mix	6	6mL	-

Box 7：Single Cell Glycosylation Detection Kit/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
ProMoSCOPE buffer	1	100µL	红色

ProMoSCOPE Primer 1	1	800 µL	透明
PMT Conjugator	1	32 µL	红色
ProMoSCOPE tag	1	400 µL	棕色
PMT Enhancer	1	120 µL	红色
HiFi PCR PreMix	1	480 µL	绿色
ProMoSCOPE Indexing Mix 1	1	30 µL	白色
ProMoSCOPE Indexing Mix 2	1	30 µL	白色
ProMoSCOPE Indexing Mix 3	1	30 µL	白色
ProMoSCOPE Indexing Mix 4	1	30 µL	白色
ProMoSCOPE Indexing Mix 5	1	30 µL	白色
ProMoSCOPE Indexing Mix 6	1	30 µL	白色
ProMoSCOPE Indexing Mix 7	1	30 µL	白色
ProMoSCOPE Indexing Mix 8	1	30 µL	白色

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

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 Ca2+ Mg2+）
- 0.4%台盼蓝染液

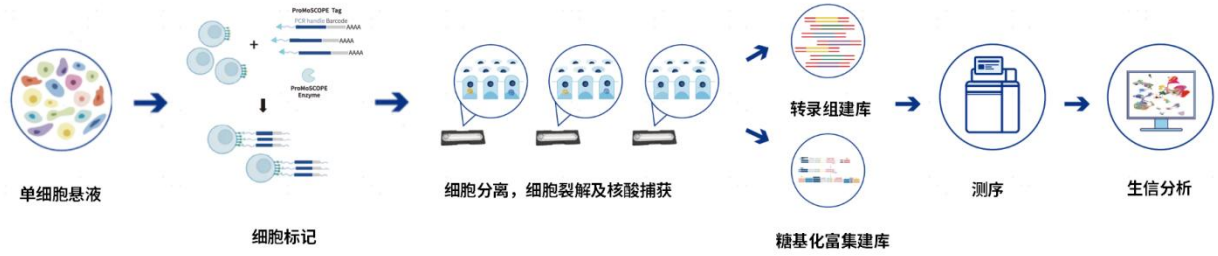
- 10 % Tween-20

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
组织解离	0.5–1h	
细胞标记	1h	
注入细胞 注入 Barcode Beads mRNA 捕获	1h	Stop, −80℃≤48h
反转录&扩增	3–4h	Stop, 4℃≤72h or −20℃≤7days
建库	3h	Stop, −20℃≤30days
糖基化富集文库构建	1h	Stop, −20℃≤30days
全流程时长	9.5–11h	

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.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	

5.1 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 ℃，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。

5.2 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℃。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 SCelLiVe 组织解离液，用无菌眼科剪剪碎组织块至肉糜状，再加入 1mL SCelLiVe 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 SCelLiVe 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 SCelLiVe 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 ℃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。

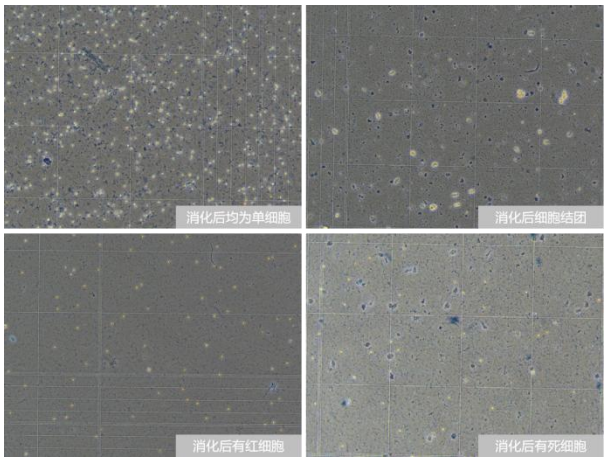


图 1：消化后均为单细胞；图 2：消化后细胞结团；图 3：消化后有红细胞；图 4：消化后有死细胞。

5.3 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。

5.4 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

6. 细胞标记、分离和 mRNA 捕获

6.1 细胞标记

准备材料:

- ProMoSCOPE Tag;
- PMT Conjugator;
- ProMoSCOPE Buffer;
- 200mM MgCl2;
- 细胞悬液（每样本不少于 1×106 cells）

自备材料:

- 1×PBS 缓冲液;
- 10%(w/v)BSA（溶解在 1×PBS 中）;
- Nuclease-free water。

1. 将 ProMoSCOPE Tag 和 ProMoSCOPE Buffer 置于室温进行解冻，完全融化后涡旋 10s 混匀，置于于冰上备用;
2. 按照下表配制 Labeling Mix:

组分	1 RXN（μL）×1
ProMoSCOPE Tag	20μL
ProMoSCOPE Buffer	3μL
PMT Conjugator	1.5μL
200mM MgCl2	3μL
Nuclease free water	2.5μL
Total	100

3. 使用显微镜或细胞计数仪，记录每个样本的细胞浓度及活性。

注意: 如细胞活性低于 85%，可使用细胞分选或死细胞去除试剂清除死细胞，获得较高活性细胞悬液。

4. 吸取不少于 1×10^6 个细胞至一个新的预冷的 1.5mL 离心管中，将离心管以 350g 离心 3 分钟，然后缓慢吸除上清液。

5. 将配制的 Labeling Mix 加入离心管中，使用移液枪轻缓吹打 5 次使细胞重悬，室温孵育 10 分钟；每隔 5 分钟，轻弹离心管，确保细胞保持悬浮状态。
6. 按下表配制 Wash Solution：

组分	1 RXN（μL）×1
10% BSA	80μL
1x PBS	3920μL
Total	100

7. 标记完成后，将离心管置于离心机中 350 g 离心 3 分钟，将上清液移除，加入 1000μL Wash Solution，移液枪轻缓吹打 5 次使细胞重悬。
8. 将离心管置于离心机中 350 g 离心 3 分钟，缓慢吸除上清液，用 Wash Solution 再重复清洗 2 次。
9. 清洗完成后，用 150μL 1x PBS 重悬细胞，使用显微镜或细胞计数仪计算悬液细胞浓度及活率。

注意: 最终的细胞数量不少于 15,000 个且细胞活性应在 85%以上。

6.2 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 200μL 的移液器吸取 200μL 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 1　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 200μL 的移液器吸取 200μL 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。

6.3 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 900μL Barcode Beads（1RXN）于 1.5 mL 离心管中，短暂离心后置于 1.5mL 规格磁力架（DynaMagTM-2 磁力架/12321D/Thermo，本小节磁力架同规格）上，静置 1min，待溶液澄清后，小心移除上清。清洗时需将离心管从磁力架上取下，加入 1mL PBS，瞬离后置于磁力架上，静置 1min，待溶液澄清后，小心移除上清，清洗 3 次即可；用移液器充分吹打混匀 Barcode Beads，确保 Barcode Beads 充分重悬。
2. 取下离心管，用 PBS 重悬定容至 60μL。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。

6.4 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

6.5 单细胞悬液制备

准备材料:

- 细胞悬浮液（来源于步骤 6.1）

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 1.0×10^5–3.0×10^5 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
3000–5000	（1.0–1.2）×10^5cells/mL
6000–9000	（1.5–2.0）×10^5cells/mL
9000–12000	（2.0–2.5）×10^5cells/mL
12000–15000	（2.5–3.0）×10^5cells/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。

6.6 单细胞分离

准备材料:

- 预处理好的 SCOPE–chip SD (见 4.1 微流控芯片准备)
- 稀释好的细胞悬液（见 6.3 细胞悬液准备）

自备材料:

- PBS
- 200 µL 移液器吸头

1. 移除进出样口多余液体，加 200µL 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 100µL 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 200μL 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。

6.7 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 4.2 Barcode Beads 准备)

自备材料:

- PBS
- 200 μL 移液器吸头

1. 吸取 60 μL 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 100μL 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 200μL 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。

6.8 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 6.2 Lysis Mix 准备）

自备材料:

- 200 μL 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 μL Lysis Mix 从进样口缓慢注入芯片，时间约 15 s，立即移除进出样口多余液体。
2. 室温静置 15 min 用于裂解细胞并释放 mRNA，让 Barcode Beads 捕获 mRNA。

6.9 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 μL 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 200μL 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 200μL 移液器吸头插入进样口，吸取 200μL 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 2　Barcode Beads 取出示意图

注意：在显微镜下观察，若孔内剩余 Barcode Beads 很多，可重复操作步骤，直至 90%以上的 Barcode Beads 被取出。 若取 Barcode Beads 过程 Barcode Beads 出现结团，可使用移液器将 Barcode Beads 轻柔吹散即可。

7. 反转录及 cDNA 合成

7.1 反转录

准备材料:

- Wash Buffer B;
- RT Master Mix (紫色);
- TS Primer(紫色);
- RNase Inhibitor (绿色);
- Reverse Transcriptase (紫色);
- 上一步骤经过碱基转换的 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 100μL 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 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 好的 RT Mix，并吹打混匀。
6. 置于提前设置好的金属浴中，42℃，转速 1300 rpm，反应 90min（提前预热）。

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

7.2 cDNA 扩增

准备材料:

- Amplification Master Mix (透明);
- A Primer Mix(透明);
- Amplification Enzyme (透明);
- 上一步的反转录产物。

自备材料:

- 0.2mL 无菌&无核酸酶八联排管
- 无核酸酶水
- DynaMagTM-2 磁力架/12321D/Thermo 或其他兼容 1.5mL 离心管的磁力架

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

Lid Temperature 105℃	Reaction Volume 50μL	
步骤	温度	时间
1	95℃	3 min
2 cycles = 4	98℃	20 sec
	65℃	45 sec
	72℃	3 min
3 cycles = 10	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
ProMoSCOPE Primer 1	12	26.4
Amplification Enzyme	8	17.6
Nuclease-free Water	176	387.2
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。

7.3 cDNA 纯化

准备材料:

- 上一步扩增后的 cDNA。

自备材料:

- 1.5mL 离心管;
- 新鲜配制的 80%乙醇;
- Nuclease-free water;
- Elution Buffer;
- AMPure XP 纯化磁珠;
- DynaMagTM-2 磁力架/12321D/Thermo 或其他兼容 1.5mL 离心管的磁力架。

注意:

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

1. 每反应准备 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 μL，则加入 0.6 x 400 =240μL 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，小心吸取上清液至新的 1.5mL 离心管中，保留并标记为糖基化 Tag 产物（保存条件同 cDNA），后续构建糖基化富集文库使用。

注意: 此纯化步骤，cDNA 结合在 Ampure XP 纯化磁珠上，带有糖基化标签的 DNA 在上清液中。

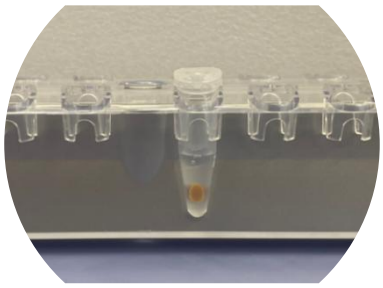


图 3　AMPure Beads 在磁力架上吸附示意图

3. 保持离心管始终处于磁力架上，加入 800μL 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 20μL 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。

7.4 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（1μL）纯化后的 cDNA 产物，用 Qubit 4.0 荧光定量仪进行浓度定量。
2. 取一份待测样品（约 5ng），用 Agilent Fragment Analyzer 5200 进行片段分布分析。
3. 合格的 cDNA 应同时满足以下几个条件：主峰片段大小应在 900-2000bp 左右；1000bp-5000bp 占比大于 15%；300bp 以下片段占比小于 40%(如图 4)。cDNA 评

级分布见下表。（若在满足“合格”类条件下同时存在基线上调或拖尾严重情况，评级评定为“风险”）

质控等级	评判标准	对应处理
合格	Qubit 检测总量＞30ng，质检主峰 900bp-2000bp 之间，1000bp-5000bp 占比>15%，300bp 以下片段占比<40%	建议直接进行建库
风险	不满足“合格/不合格”任一评级条件	尝试风险建库
不合格	Qubit 检测总量<30 ng，质检主峰<500bp 或主峰不明显	不建议进行建库实验

4. 若质检发现 cDNA 300bp 以下片段占比在 10-40%时，将剩余 cDNA 的体积用无核酸酶水补充到 100μL，然后按下表的磁珠比例进行二次纯化。二次纯化后满足步骤 2 的“合格”要求仍可直接建库。

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

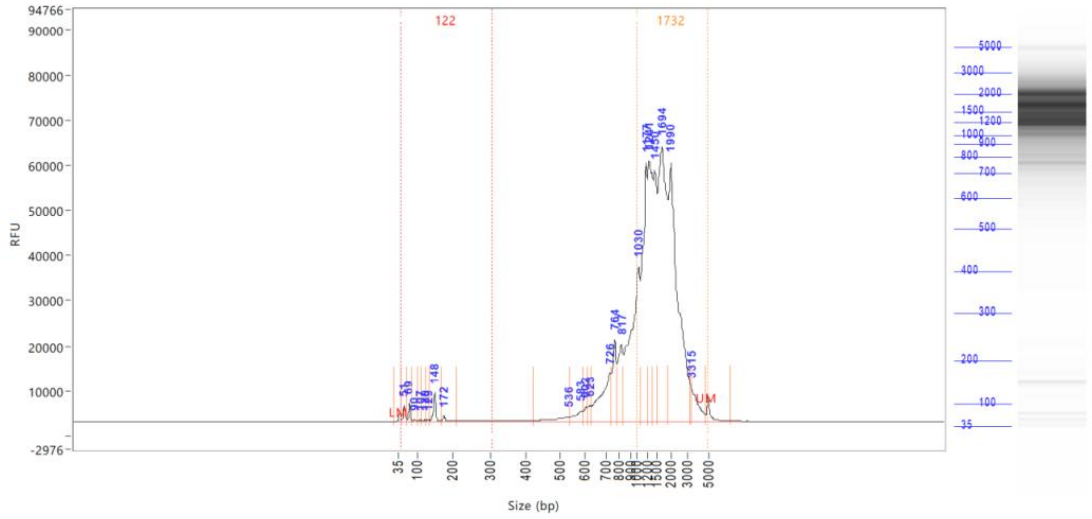


图 4　符合质控标准的 cDNA 片段的质控展示图

8. 转录组文库制备

8.1 片段化

准备材料:

- Fragmentation Buffer V3（橙色）；
- Fragmentation Enzyme Mix V3（橙色）；
- 1×TE（橙色）；
- 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。

8.2 接头连接

准备材料:

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

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。

8.3 接头连接后产物纯化

准备材料:

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

自备材料:

- Nuclease-free Water;
- AMPure XP 纯化磁珠;
- 新鲜配制的 80%乙醇;
- PCR 仪;
- 不同量程单通道移液器;
- 无核酸酶 PCR 管;
- 磁力架/TND08-C-A/深圳拓能达 或DynaMagTM-PCR 磁力架/492025/Invitrogen

注意:

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

1. 每个反应准备 0.5mL 80%乙醇和 25μL 0.1 X TE 溶液（将 1 X TE 与无核酸酶水以 1:10 稀释）。

2. 将产物 PCR 管短暂离心，用移液器测量体积，加入 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 x 68.5=13.7 μL 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 8.4 PCR 富集。

注意: 此步骤结束后可以将样品于 4℃保存 72 小时，-20℃保存一周。

8.4 PCR 扩增

准备材料:

- Library Amp Mix V3（白色）；
- Indexing Primer Mix（白色）；
- 步骤 8.3 的接头连接后纯化产物。

1. 提前按照下表设置 PCR 富集程序，并使 PCR 仪热盖保持在 105℃，反应体积 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 8.3 产物）	15
Library Amp Mix V3	25
Indexing Primer Mix	10
Total	50

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

扩增循环数需按 cDNA 投入量进行选择，选择要求如下：

cDNA 投入量	参考循环数
50ng	10
10ng	12

8.5 扩增产物片段分选

准备材料：

- 步骤 8.4 的 PCR 富集产物。

自备材料：

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

注意：

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

1. 每个反应准备 0.5mL 80%乙醇。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，涡旋振荡混匀，室温孵育 5min。
4. 将 PCR 管短暂离心后置于磁力架上，使纯化磁珠与液体分离，待溶液澄清后（约 5min），小心转移上清液置于新的 PCR 管暂时留存。
5. 保持 PCR 管始终处于磁力架上，加入 200μL 新鲜配制的 80% 乙醇漂洗磁珠。室温孵育 30s，小心移除上清。
6. 重复步骤 6，总计漂洗 2 次。
7. 从磁力架上取下 PCR 管，短暂离心，再次置于磁力架上，吸去多余酒精，开盖晾干磁珠 1min（不要超过 2min）。
8. 将 PCR 管从磁力架上取出，加入 20μL Elution Buffer 洗脱。涡旋振荡 15s 混匀纯化磁珠，室温孵育 5min。
9. 将 PCR 管短暂离心并置于磁力架上，使纯化磁珠与液体分离，待溶液澄清后（约 5min）小心吸取 18μL 上清至新的灭菌 1.5mL 离心管中。

重要提示: 此步骤结束后可以将样品于-20℃或-80℃保存三个月。

8.6 文库质检

准备材料:

- 上一步骤纯化产物。

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。
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

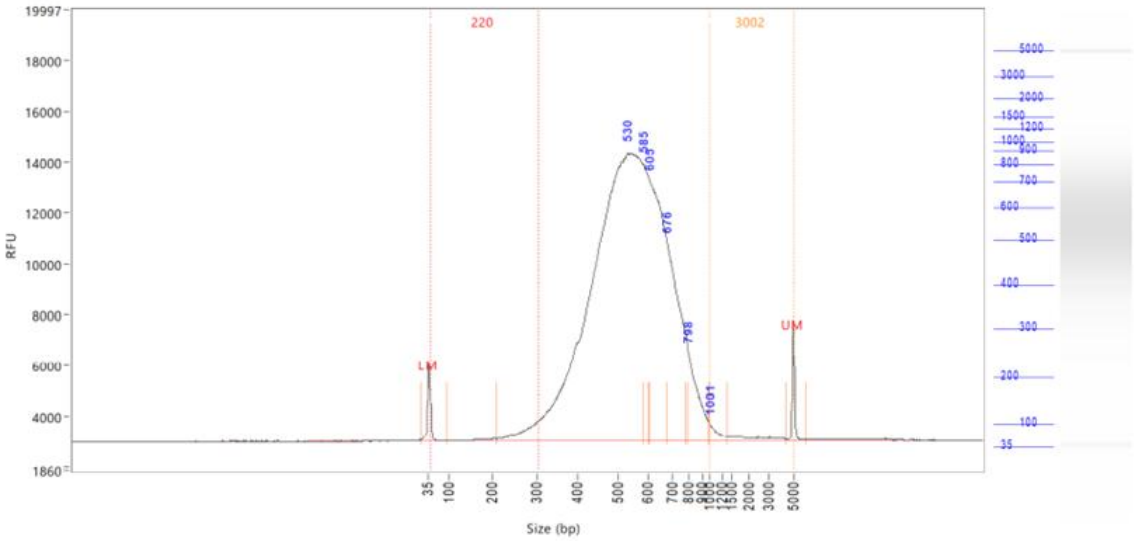


图 5　文库质检图

9. 糖基化富集文库制备

9.1 糖基化标签产物纯化

准备材料:

- 糖基化 Tag 产物（来自步骤 7.3）。

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. 吸取糖基化 Tag 产物（来自步骤 7.3）200μL，转移至一个新的 1.5mL 离心管中，加入 75μL 混匀的磁珠，涡旋混匀，室温孵育 5 min。
2. 将离心管短暂离心，置于磁力架上，静置 5min 至液体透明澄清;
3. 保持离心管始终处于磁力架上，移除上清液，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。
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（不超过 5 分钟）。
6. 取下离心管，加入 50μL 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。
7. 吸取上清并转移至新的 1.5mL 离心管中，即为糖基化标签纯化产物。

注意: 糖基化标签纯化产物于 4℃可保存 72h，在 −20℃可保存 1 周。

9.2 糖基化标签富集

准备材料:

- 糖基化标签纯化产物（来自步骤 9.1）；
- HiFi PCR PreMix;
- ProMoSCOPE Indexing Mix。

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。

1. 提前按照下表设置片段化 PCR 程序。

热盖温度：105℃		反应体积：50 μL
步骤	温度	时间
1	95℃	0:03:00
2 cycles = 4	98℃	0:00:30
	65℃	0:00:30
	72℃	0:01:00
3	72℃	0:05:00
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	1 RXN（μL）
HiFi PCR PreMix	25
ProMoSCOPE Indexing Mix	5
Nuclease-free Water	19
糖基化标签纯化产物(来自 9.1)	1
Total	50

注：ProMoSCOPE Indexing Mix 包括 2~8 种，任意选择一种即可，一个样本对应一个 Pro

9.3 糖基化富集文库纯化

准备材料:

- 糖基化富集产物（来自步骤 9.2）。

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. 将产物 PCR 管短暂离心，用移液器测量体积，加入 60μL 混匀的磁珠（1.2×产物体积），涡旋混匀，室温孵育 5 min。
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。
3. 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。

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. 取下离心管，加入 20μL 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。

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 糖基化富集文库质检

准备材料:

- 步骤 9.3 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。
3. 理想的富集文库应(如图 6)会有一个峰值，峰值区间在 270~290bp。

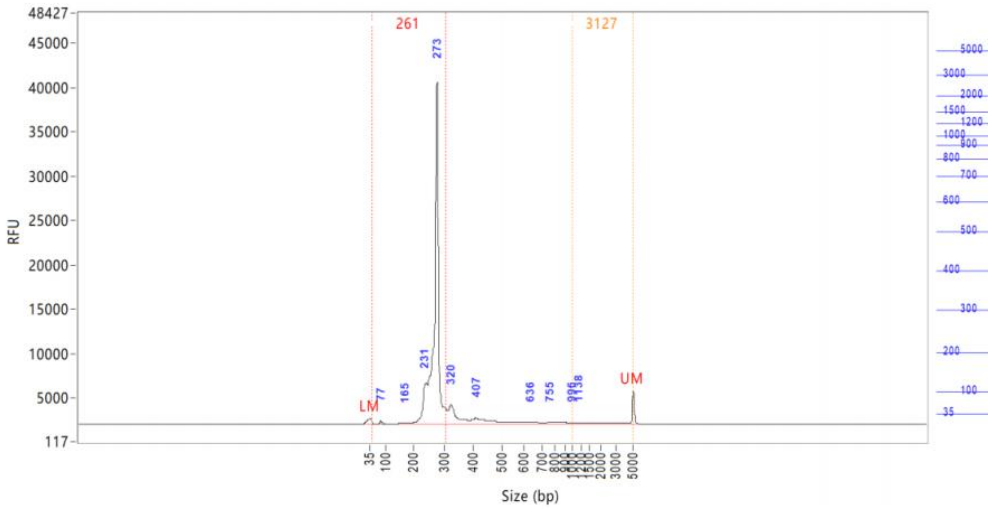


图 6 糖基化富集文库产物质检图

附录 A　技术原理

基于酶促糖基化原理，在测序前经过糖基转移酶连接 Tag 进行细胞标记，使其携带特异的 Tag Barcode 信息。随后，利用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 Barcoding)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，带有独特细胞标签及分子标签(UMI)的 Barcode Beads 通过结合 mRNA 或 Tag 标签上的 poly (A) 尾，使细胞内 mRNA 和 Tag Barcode 被加上相同的 Cell Barcode。收集芯片中的 Barcode Beads，将其捕获的 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与糖基化富集文库。

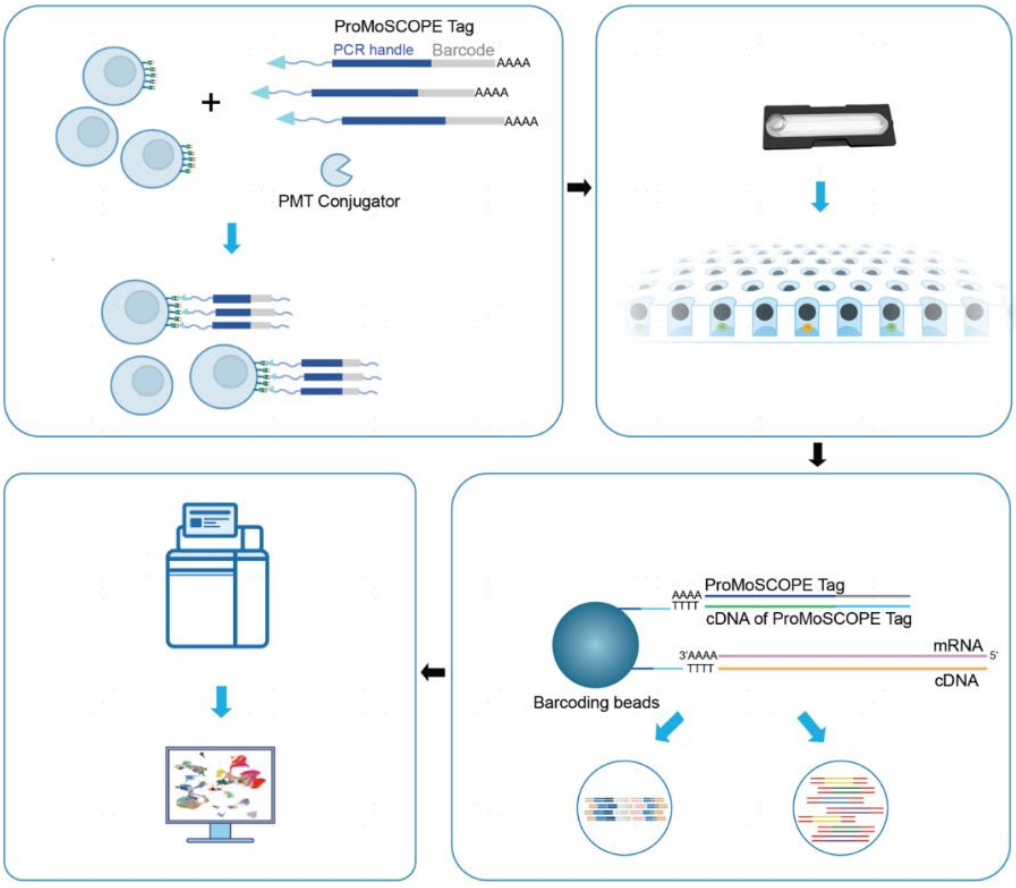


图 A1：高通量单细胞糖基化检测技术路线图

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 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 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。

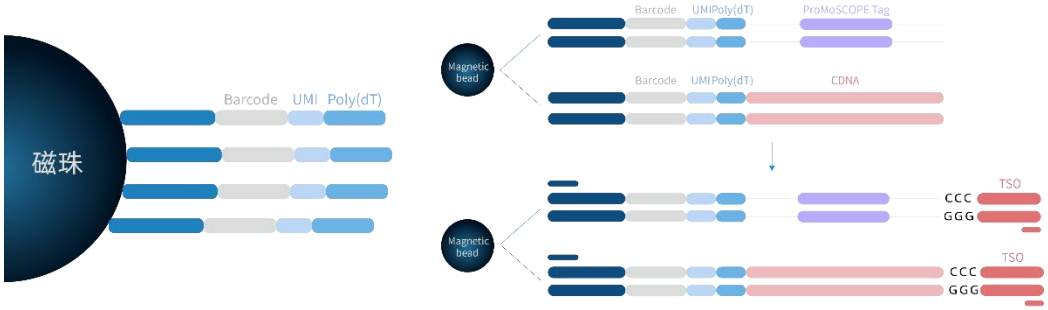


图 A2：磁珠捕获 mRNA 及反转录原理图

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

cDNA 富集

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。

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。

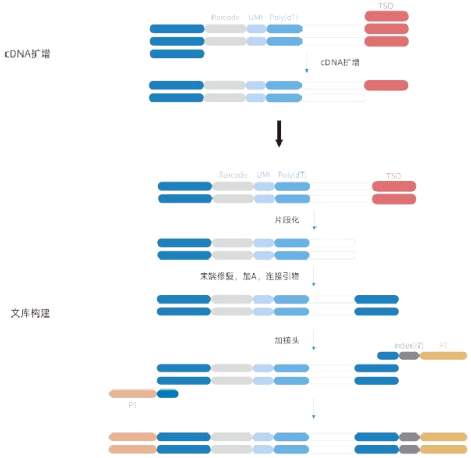


图 A3：转录组文库构建原理图

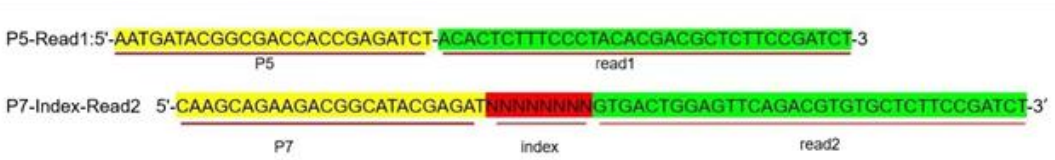


图 A4：转录组 illumina 文库结构图（左右两侧序列）

糖基化富集文库构建

Barcode Beads 捕获 Tag Barcode 并通过 RT-PCR 获得 cDNA,再以 cDNA 为模板，Barcode Beads 特异富集引物对 Tag Barcode 进行富集，通过低循环扩增技术，特异性完成富集文库构建。

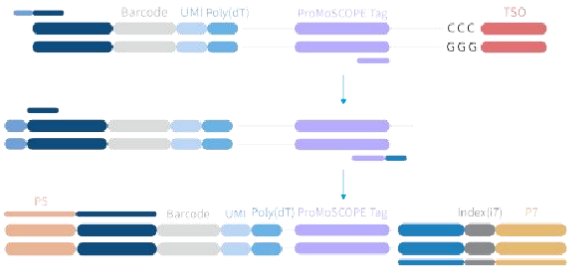


图 A5：糖基化富集文库构建原理

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。

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）