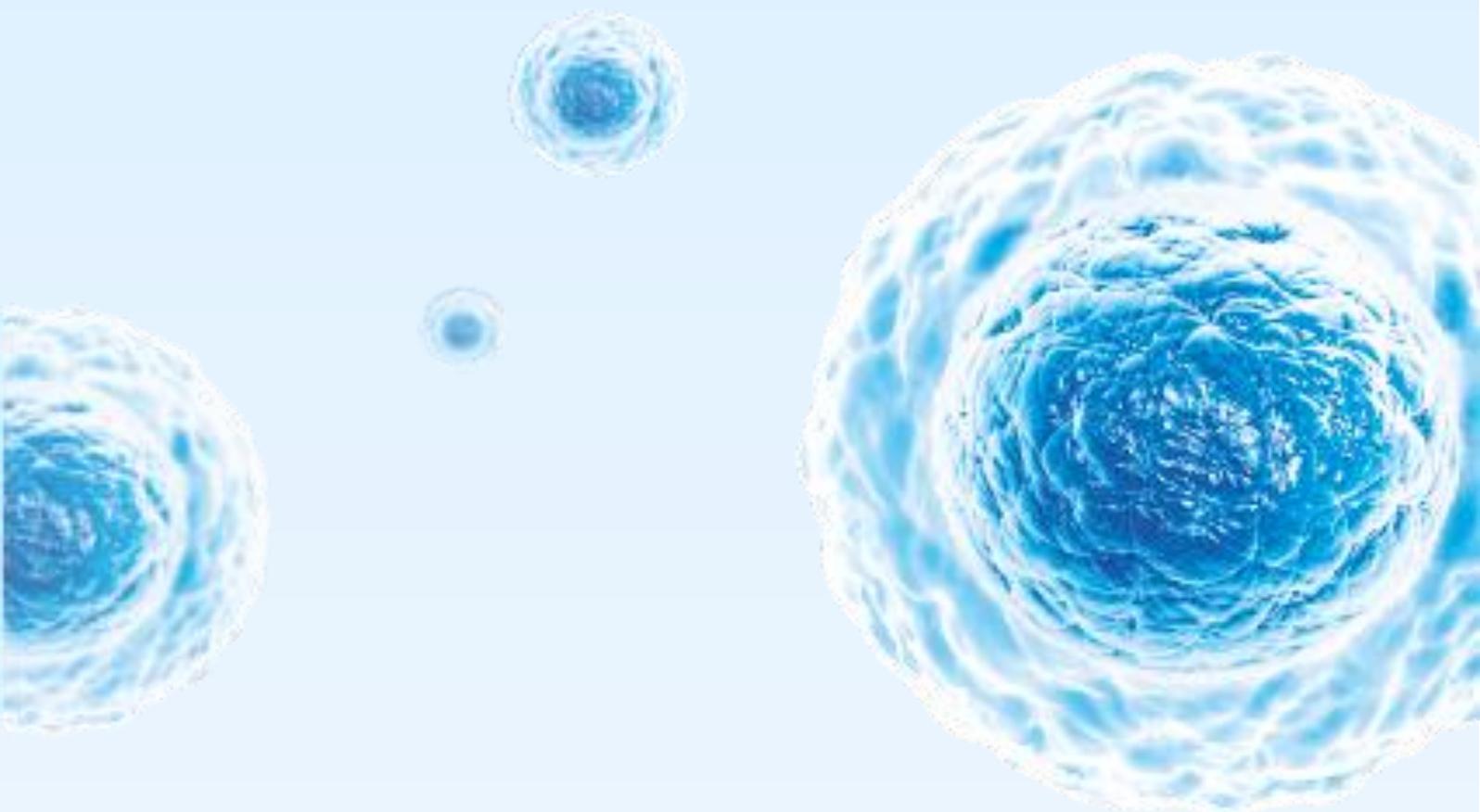


Singleron
新格元生物科技



Single Cell ATAC Library Kit Cell for SD
单细胞 ATAC 建库试剂盒(SD)用户手册·手动版

本用户手册适用于以下产品

目录号	品名	规格
1395011	Single Cell ATAC Library Reagent Kits	2 RXNs
1395012	Single Cell ATAC Library Reagent Kits	16 RXNs

文件信息

- 文件名称: 单细胞 ATAC 建库试剂盒用户手册 (SD/手动版)
- 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	2 . ● 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 产品概况.....	4
1.1 产品说明.....	4
1.2 技术原理.....	4
1.2.1 技术流程及操作时间.....	6
1.3 产品组成.....	6
1.4 各模块组分.....	7
1.4.1 Single Cell ATAC Reagent Kits.....	7
2 用户自备仪器设备和试剂耗材.....	10
3 实验操作流程.....	12
3.1 实验操作注意事项.....	12
3.2 实验操作总体流程.....	13
3.3 单细胞分选和 ATAC 产物捕获.....	14
3.3.1 细胞核提取.....	14
3.3.2 细胞核转座和 scATAC Beads SD 准备.....	15
3.3.3 芯片操作.....	16
3.3.4 细胞裂解&转座产物捕获.....	18
3.3.5 取出 scATAC Beads SD.....	18
3.4 连接及扩增.....	18
3.4.1 连接.....	18
3.4.2 PCR 扩增.....	20
3.4.3 产物纯化.....	20
3.4.4 扩增纯化产物质检.....	21
附录 1: ®组织保存液说明书.....	23
附录 2: 组织解离液说明书.....	24
附录 3: DNaseI 处理细胞说明书.....	27
附录 4: 冻存组织提核方法.....	28
附录 5: 生物废弃物分类及处理标准.....	30
附录 6: 常见问题与解答.....	32

1 产品概况

1.1 产品说明

单细胞 ATAC 建库试剂盒可完成新鲜或冻存组织样本细胞核提取、细胞核转座、单细胞核分选至 ATAC 文库构建的全部流程。单细胞 ATAC 建库试剂盒包括细胞核分离液，转座试剂、微流控微孔芯片，scATAC 分子标签磁珠，产物连接及 scATAC 文库构建试剂。本产品利用 Tn5 转座酶特性，将含有测序接头的序列引入到染色质可及性区域，然后通过 scATAC Beads 捕获转座后的产物，扩增从而构建 ATAC 文库。本产品在简化操作过程的同时，能高效地捕获转座产物，构建高通量单细胞 ATAC 文库。

单细胞 ATAC 建库试剂盒的性能特征和优势如下：

1. 操作流程简单，可手动操作，无需特殊仪器。
2. 高通量的单细胞水平上，稳健灵敏分析整个细胞中染色质可及性区域。
3. 适用于不同细胞类型，具有广谱性。

1.2 技术原理

scATAC (single-cell assay for transposase-accessible chromatin using sequencing) 是一种用于单个细胞测序的染色质可及性测序技术。它利用转座酶将测序接头插入到细胞染色质中的开放染色质区域，然后进行 PCR 扩增和测序，以获得单个细胞的染色质可及性图谱。

本产品利用 Tn5 转座酶特性，将含有测序接头的序列引入到转座区域，利用微流控芯片技术将转座完成的细胞核分离成单细胞核水平，并将数十万个携带独特寡核酸序列的 scATAC Beads 加入到芯片微孔中，确保每个微孔内都能落入 1 个 scATAC Bead。细胞裂解后，带有细胞标签 (Cell Barcoding) 的磁珠完成对细胞核转座产物的捕获并进行标记。随后 scATAC Beads 完成预扩增以及 scATAC 文库构建，扩增产物分选后符合质控要求即可进行文库测序。



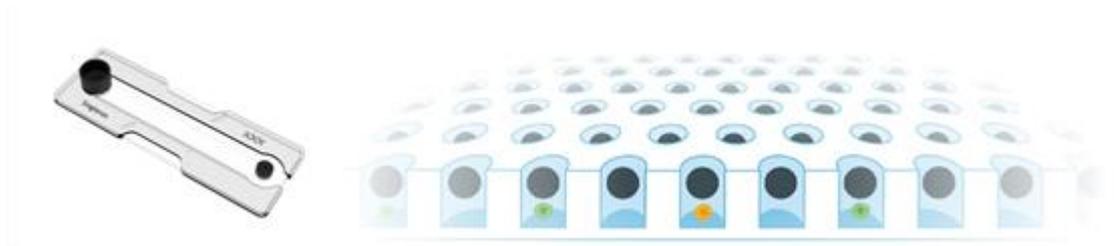
Figure 1. Schematic diagram of bead



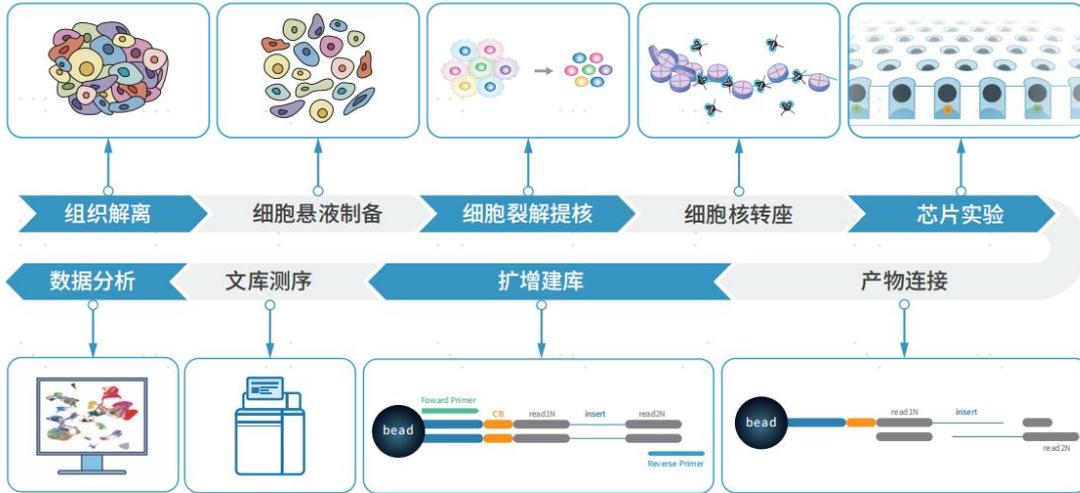
Figure 2. Transposed DNA product



Figure 3. Schematic diagram of the principle of DNA fragment capture by beads.



1.2.1 技术流程及操作时间



步骤	时间	终止&保存
细胞准备	0.5 - 1 h	
细胞裂解提核	0.5 - 1 h	
细胞核转座	0.5 h	
芯片实验	0.5 - 1 h	Stop, -80 °C ≤ 48 h
产物连接	1.5 h	
扩增建库	0.5 h	Stop, -20 °C ≤ 30 days
全流程时长	4 - 5.5 h	

1.3 产品组成

---Single Cell ATAC Library Kit 2 RXNs

模块名称	储存条件
Single-cell ATAC Nuclei isolation and Fragments Capture	2°C~8°C
Single-cell ATAC Transposition and Amplification/S	-25°C~-15°C

---Single Cell ATAC Library Kit 16 RXNs

模块名称	储存条件
Nuclei isolation and Fragments Capture-Multi	2°C~8°C
SCOPE-chip SD	2°C~8°C
Wash Buffer A	2°C~8°C
Single-cell ATAC Transposition and Amplification/L	-25°C~-15°C

1.4 各模块组分

1.4.1 Single Cell ATAC Reagent Kits

---Single Cell ATAC Library Kit 2 RXNs

Single-cell ATAC Nuclei isolation and Fragments Capture (2°C~8°C)

Component Name	Quantities(2 RXN)	Volume/pc(2RXN)
1 × ATAC Nuclei Isolation Buffer	1	220 μL
Nuclei Wash Buffer	1	4.5 mL
Nuclei Isolation Dilution Buffer	1	440 μL
scATAC Beads SD	1	1800 μL
Wash Buffer A	1	13 mL
SCOPE-chip SD	2	-
Singleron Magnetic Rack	1	-
scATAC lysis buffer	1	220 μL
Transposition Stop Buffer	1	220 μL

Single-cell ATAC Transposition and Amplification/S (-25°C~-15°C)

Component Name/Index	Quantity(2 RXN)	Volume/pc(2RXN)	
Transposition buffer Mix	1	55 μL	
Transposition Enzyme	1	8 μL	
Ligation Buffer	1	110 μL	
Ligation Enzyme	1	11 μL	
scATAC Amplification Master Mix	1	440 μL	
scATAC index Primer Mix 1	TTACTCGC	1	60 μL
scATAC index Primer Mix 2	TCGTTAGC	1	60 μL

---Single Cell ATAC Library Kit 16 RXNs

Nuclei isolation and Fragments Capture-Multi (2°C~8°C)

Component Name	Quantity (16RXNs)	Volume/pc(16 RXNs)
1 × ATAC Nuclei Isolation Buffer	1	1760 μL
Nuclei Wash Buffer	8	4.5 mL
Nuclei Isolation Dilution Buffer	2	1760 μL
Transposition Stop Buffer	1	1760 μL
scATAC Beads SD	8	1800 μL
scATAC lysis buffer	1	1760 μL

SCOPE-chip SD (2°C~8°C)

Component Name	Quantity (16RXNs)	Volume/pc(16 RXNs)
SCOPE-chip SD	16	-
Singleron Magnetic Rack	4	-

Wash Buffer A (2°C~8°C)

Component Name	Quantity (16RXNs)	Volume/pc(16 RXNs)
Wash Buffer A	7	13 mL

Single-cell ATAC Transposition and Amplification/L (-25°C~-15°C)

Component Name/Index		Quantities16 RXNs	Volume/pc(16RXNs)
Transposition buffer Mix		1	440 μL
Transposition Enzyme		1	55 μL
Ligation Buffer		1	880 μL
Ligation Enzyme		1	88 μL
scATAC Amplification Master Mix		2	1760 μL
scATAC index Primer Mix 1	TTACTCGC	1	60 μL
scATAC index Primer Mix 2	TCGTTAGC	1	60 μL
scATAC index Primer Mix 3	TACCGAGC	1	60 μL
scATAC index Primer Mix 4	TGTTCTCC	1	60 μL
scATAC index Primer Mix 5	TTCGCACC	1	60 μL
scATAC index Primer Mix 6	TTGCGTAC	1	60 μL
scATAC index Primer Mix 7	TCTACGAC	1	60 μL
scATAC index Primer Mix 8	TGACAGAC	1	60 μL

2 用户自备仪器设备和试剂耗材

		名称
样本制备环节	设备	医用冷藏冷冻箱
	仪器	电子天平
		双功能数显恒温振荡器
		高速冷冻离心机
		倒置显微镜/荧光显微镜（可选）
		荧光细胞分析仪（可选）
	试剂	RNase away
		无水乙醇
		75%乙醇（用无水乙醇配制，现配现用）
		1×PBS
		1×HBSS
		0.04%台盼蓝染液
	耗材	无菌培养皿（6cm）
		锥型低吸附无菌离心管 15mL（Falcon）
		锥型低吸附无菌离心管 50mL（Falcon）
		研磨杵
		细胞滤网(40μm、70μm)
		不同规格无菌&无核酸酶吸头（推荐 Axygen）
	工具	不同量程单道移液器
		医用眼科镊 10cm 直尖头
		医用眼科剪
转座和连接环节	设备	-80°C医用低温保存箱
		医用冷藏冷冻箱
	仪器	恒温振荡金属浴
		旋转仪
	试剂	1×PBS
		Nuclease-free Water
	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
		0.5mL PCR 透明薄壁管 (Qubit 定量, 推荐 Axygen)
	工具	不同量程单道移液器
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 (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
		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
		0.5mL PCR 透明薄壁管 (Qubit 定量, 推荐 Axygen)
	工具	不同量程单道移液器
		DynaMag™-PCR 磁力架/492025/Thermo

3 实验操作流程

3.1 实验操作注意事项

1. 请严格按照保存条件储存试剂盒，特别注意 **scATAC Beads SD** 不能存放于 **0°C** 以下环境。
2. 若试剂溶液中有沉淀物，请用手指轻弹试剂管壁，并用涡旋仪涡旋 10 s 以上混匀试剂溶液，确保试剂溶液澄清后再使用。
3. 实验开始前，用 RNase away 喷洒实验台，5 min 后擦干即可。
4. 本实验中所用耗材需保证无菌、无核酸酶，实验人员需戴口罩和无菌手套进行操作，避免污染。
5. 细胞悬液需经过严格质控，细胞活性过低不能保证最后实验结果。质控要求如下：

质量指标	合格范围
细胞总量	> 500000
细胞活性	≥ 85%

注：一般投入 50 万细胞足够下游实验，最少不低于 10 万细胞。

6. 芯片加样时可在入口端（小口端）保留一滴液体，避免引入气泡。
7. 芯片加样时应保持移液器垂直，时间控制在 30 s 左右，确保匀速注入。低于 30 s 注入细胞核，微孔中掉落的细胞核会少于预期，高于 30 s 注入细胞核，会增加微孔中的双细胞核率。同样，注入与冲洗 scATAC Beads SD 时也应做到缓慢匀速。
8. 芯片中落入细胞核数过少的原因可能有以下几点（需避免）：
 - 1) 细胞核浓度未达到要求，或注入芯片前未吹打混匀。
 - 2) 注入细胞核的速度过快。
 - 3) 注入细胞核后未静置 5 min 就使用 PBS 冲洗。
 - 4) PBS 冲洗速度过快。
9. 注入 scATAC Beads SD 后静置 1 min 使 scATAC Beads SD 落入孔内，然后使用 PBS 冲洗。
10. 注入 scATAC Beads SD 后，要确保 scATAC Beads SD 的铺满率大于 95%。
11. 注入 scATAC Beads SD 后，铺满率未达到要求时可回收出口处冲出的 beads 重复注

入。若芯片进口端 scATAC Beads SD 空缺较多，可将回收的 scATAC Beads SD 置于磁力架上，移除上清液提高 beads 密度后再次注入到 beads 空缺处，静置 10 s 后再冲洗；同理，若芯片出口端 scATAC Beads SD 空缺较多，可将回收的 scATAC Beads SD 注入到出口槽处，用移液器从进口端将 beads 吸入空缺处，静置 10 s 后再冲洗。

12. 注入 scATAC Beads SD 结果不理想的原因可能有以下几点：

- 1) 注入 scATAC Beads SD 时未做到缓慢匀速。
- 2) 注入时速度过快，或用 PBS 冲洗时速度过快。

13. 产物纯化过程中，Ampure XP 纯化磁珠（以下简称磁珠）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。

14. 建库过程中，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。

3.2 实验操作总体流程

注：Single Cell ATAC Library Kit 可以从细胞悬液开始操作，也可以从组织解离开始操作。

样本若为细胞悬液：

1) 细胞悬液符合质控，直接进入 **3.3.1 细胞核提取** 步骤

质量指标	合格范围
细胞总量	> 500000
细胞活性	≥ 85%

2) 细胞悬液满足细胞量（大于 50 万细胞），活性<85%，考虑 DNaseI 处理去除死细胞，参考

附录 3：DNaseI 处理细胞说明书，再开始细胞核提取

样本若为组织样本：

1) 新鲜组织，参考**附录 2：组织解离液说明书**，获得符合质控要求的细胞悬液后开始细胞核提取

2) 冷冻组织，参考**附录 4：冻存组织提核方法**直接获得细胞核后，进入 3.3.2 细胞核转座和 scATAC Beads SD 准备流程

3.3 单细胞分选和 ATAC 产物捕获

3.3.1 细胞核提取

1. $1 \times$ ATAC Nuclei Isolation Buffer、Nuclei Isolation Dilution buffer 和 Nuclei Wash buffer，轻轻颠倒混匀，置于冰上备用。
2. 配制 $0.2 \times$ ATAC Nuclei Isolation Buffer，混匀后放置冰上备用

Reagents	Volume (1 reaction)
$1 \times$ ATAC Nuclei Isolation Buffer	22 μ l
Nuclei Isolation Dilution buffer	88 μ l
Total	110 μ l

注：不同细胞类型的 ATAC Nuclei Isolation Buffer 裂解乘数存在差异，可从低乘数的裂解液测试裂解效果。 $1 \times$ ATAC Nuclei Isolation Buffer 可使用 Nuclei Isolation Dilution buffer 稀释到相应的裂解乘数。

3. 细胞悬液 350 rcf 离心 3 min，弃上清，1 mL PBS 重悬细胞，取 10 μ l 细胞重悬液加入等体积的 AOPI/台盼蓝进行细胞计数和活性测定。

注：细胞活性要求不低于 85%，理想的细胞活性高于 95%；当细胞活性在 70%~85% 时，可以使用 DNaseI 进行处理，详见附录 3。

4. 取 5×10^5 细胞离心，弃上清，加入 100 μ l $0.2 \times$ ATAC Nuclei Isolation Buffer，吹打混匀，冰上反应，每隔 30s ~ 1min 取 5 μ l 裂解产物加入 10 μ l 台盼蓝染色、镜检，当视野中 70~80% 的细胞裂解时(通过细胞活性判断，如果观察 2 次后活细胞依然较多，活性大于 50%，可以加入 5 μ l $1 \times$ ATAC Nuclei Isolation Buffer 在细胞悬液中，再次镜检，观察，依此类推，裂解时间最长建议不超过 8min)，当细胞活性约 20%~30% 时候，加入 1 mL Nuclei Wash buffer 混匀，500 rcf、4°C 离心 5min。

注：提取细胞核质量判断：细胞核提取过程中，使用台盼蓝染色观察裂解情况时，可通过观察细胞核膜边界完整性判断细胞核的质量。

4. 离心后弃上清，加入 15 μ l PBS 重悬细胞核，取 1 μ l 细胞核重悬液加入 19 μ l AOPI 细胞计数染料进行细胞核计数。
5. 细胞核提取质控标准

质控等级	评判标准	对应处理
合格	细胞核外形规整未出现裂解过度导致细胞核破裂；细胞核悬液杂质比例<10%；细胞核浓度>3.0×10 ⁶ nuclei/mL	建议直接进行转座
风险	细胞核数量>3.0×10 ⁶ nuclei/mL，不满足“合格/不合格”任一评级条件	尝试风险转座
不合格	细胞核<3.0×10 ⁶ nuclei/mL，细胞核外形破裂比例>30%	重新提核

3.3.2 细胞核转座和 scATAC Beads SD 准备

细胞核转座体系

组分	体积
Transposition buffer Mix	25 μl
Transposition Enzyme	3 μl
Nuclease-free Water	5.5 μl
Nuclei + PBS	16.5 μl
Total	50 μl

细胞捕获数量和细胞核 loading 芯片关系如下表所示：

细胞捕获数量	细胞核投入量
4000 - 6000	(1.5 – 2.0) × 10 ⁵ nuclei/mL
6000 - 8000	(2.0 – 2.5) × 10 ⁵ nuclei/mL
8000 - 10000	(2.5 – 3.0) × 10 ⁵ nuclei/mL

注：上表中列出的细胞捕获数量和细胞核 loading 芯片关系可以作为转座体系细胞核投入量的参考。推荐转座体系中细胞核投入量为 1.0 × 10⁵，细胞核数量不足可以按照最低浓度 5.0 × 10⁴ 投入。不同样本类型影响最终的细胞捕获数量，最终的细胞捕获数量以测序结果为准。

例：假设细胞核投入数量为 1.0 × 10⁵，细胞核原始浓度为 8 × 10⁶ nuclei/mL，细胞核的投入量为 1.0 × 10⁵ / (8 × 10⁶ nuclei/mL) = 12.5 μL，PBS 加入体积 16.5 – 12.5 = 4 μL。

1. 按照上表完成转座体系配置后，轻轻吹打混匀，置于 PCR 仪中 37 °C 反应 30 min。
2. 转座反应结束前 10 min，清洗 scATAC Beads SD：
 - 1) 将 scATAC Beads SD 用移液枪（1000 μ L 量程）轻柔吹打混匀后，吸取 900 μ L scATAC Beads SD（1RXN）于 1.5 mL 离心管中
 - 2) 短暂离心后置于 1.5 mL 规格磁力架（DynaMag™-2 磁力架/12321D/Thermo，本小节磁力架同规格）上
 - 3) 静置 1 min，待溶液澄清后，小心移除上清。
 - 4) 将离心管从磁力架上取下，加入 1 mL PBS，瞬离后置于磁力架上，静置 1 min，待溶液澄清后，小心移除上清
 - 5) 重复步骤 4) 清洗过程 2 - 3 次
 - 6) 清洗完成后，加入 60 μ L PBS（1RXN）重悬，室温放置待用。

注：若 1h 内不使用，需放置于 4°C 暂存。此时可将 scATAC Lysis Buffer 拿出平衡到室温。

3.3.3 芯片操作

3.3.3.1 芯片前处理

1. 将微流控芯片置于干净的培养皿上，用 200 μ L 的移液器吸取 200 μ L 100%无水乙醇从进样口注入芯片，时间控制在 10 s，可使用移液器在芯片中来回抽吸 100%无水乙醇直至芯片中不再出现气泡，及时移除出样口处液体。
2. 重复步骤 1 的冲洗过程 2 - 3 次，（重复时不用反复抽吸）。
3. 移除出样口处液体后，吸取 200 μ L 1% PBST（PBS 中包含 1% Tween-20）从进口处注入芯片，时间控制在 10 s 以内，及时移除出样口处液体（不用反复抽吸）。
4. 重复步骤 3 的冲洗过程 2 次，出样口处保留少量液体，最后盖上培养皿盖，室温静置备用。

3.3.3.2 注入细胞核

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 10 s 以内），然后移除出样口及进样口多余液体，重复润洗 1 次。
2. 转座完成的细胞核（50 μ L），使用 PBS 将体积补至 120 μ L，取 10 μ L 细胞核重悬液加入 10 μ L AOPI 细胞计数染料进行细胞核计数，取含 $(3.0 - 3.5) \times 10^4$ 转座后的细胞核，

PBS 定容至 100 μL ，用 200 μL 的移液器轻轻吹打混匀后，将其缓慢匀速（约 30 s）注入芯片，立即移除出样口多余液体。

3. 静置 5 min 使细胞核落入微孔内，静置期间可在显微镜下观察细胞核落入微孔情况。
4. 待细胞核落入微孔内，吸取 200 μL PBS 缓慢匀速（约 30 s）注入芯片冲洗掉多余细胞核，立即移除进出样口液体。
5. 重复 1 次步骤 4，冲洗掉留在表面未落入微孔内的细胞核。

注：在显微镜下观察表面黏附的多余细胞核是否去除干净，若还有残留，可继续加 PBS 冲洗（冲洗时应缓慢匀速）。

6. （选做）在显微镜下拍照计数各视野的细胞数，记录数据。

3.3.3.3 注入 scATAC Beads SD

1. 吸取 60 μL 重悬好的 scATAC Beads SD，缓慢匀速（约 30 s）加入进样口，将 scATAC Beads SD 注入芯片。
2. 多次吸取 100 μL PBS，缓慢匀速（约 30s）加入进样口，使 scATAC Beads SD 缓慢流动，并及时吸取出样口 scATAC Beads SD，直至达到芯片的另一端，在此期间收集进出样口的多余 scATAC Beads SD。
3. 吸取 200 μL PBS 缓慢匀速注入芯片（约 30 s），吸去进出样口多余液体。
4. 重复 1 - 3 次步骤 3，至冲洗掉多余的 scATAC Beads SD。

注：①在显微镜下观察多余 scATAC Beads SD 是否去除干净，若还有残留，继续加 PBS 冲洗。②在没有确定达到要求以前，进出样两端的 scATAC Beads SD 都应回收。

5. 显微镜下观察 scATAC Beads SD 掉入孔中的情况，若芯片进口端 scATAC Beads SD 空缺较多，可将回收的 scATAC Beads SD 置于磁力架上，吸除上清液提高 beads 密度后再次注入到 beads 空缺处，静置 10 s 后再冲洗；同理，若芯片出口端 scATAC Beads SD 空缺较多，可将回收的 scATAC Beads SD 注入到出口槽处，用移液器从进口端将 beads 吸入空缺处，静置 10 s 后再冲洗。

注：推液体时要保证芯片两端口处有适量的 PBS 以防止气泡进入芯片。

3.3.3.4 注入 scATAC Lysis Buffer

吸取 100 μL scATAC Lysis Buffer 从进样口缓慢匀速注入芯片，时间约 30 s，立即移除进出样口多余液体。

注：scATAC Lysis Buffer 较为粘稠且容易产生气泡，加样时需留意勿将气泡注入芯

片。Loading scATAC Lysis Buffer 时候应保持缓慢匀速，不要过快。

3.3.4 细胞裂解&转座产物捕获

室温静置 15 min 用于裂解细胞核并释放细胞核中的产物，让 scATAC Beads SD 捕获产物。

3.3.5 取出 scATAC Beads SD

1. 取 1.5 mL 离心管，标记后置于 1.5 mL 管的 1.5 mL 规格磁力架上。
2. 保持新格元磁力架置于芯片底部，用 200 μ L Wash Buffer A 加入到出样口凹槽，快速润洗出样口凹面，润洗完毕后立即移除液体。
3. 用 200 μ L wash buffer A 加入出样口，将新格元磁力架转移置于芯片顶部，静置 1 min，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 scATAC Beads SD 的液体转移至预冷的 1.5 mL 离心管内。
4. 重复 2 次步骤 3，收集全部 scATAC Beads SD。

注：在显微镜下观察，若孔内剩余 scATAC Beads SD 很多，可重复操作步骤，直至 90% 以上的 scATAC Beads SD 被取出。

注：若取 scATAC Beads SD 过程 Barcoding Beads 出现结团，可使用移液器将 scATAC Beads SD 轻柔吹散即可。取出的 scATAC Beads 可直接进行下一步连接反应，也可放置在 -80°C 保存 3 天。-80°C 保存后，可将 scATAC Beads 取出，室温平衡静置 5–10 min，试剂恢复液体状态即可。

3.4 连接及扩增

3.4.1 连接

1. 体系配置：提前室温解冻 Ligation Buffer，涡旋 3 s 后短暂离心然后置于冰上，在冰上按照如下表格配制连接反应体系，上下颠倒混匀。

组分	1 RXN (μ L) \times 1
Ligation Buffer	50

Ligation Enzyme	5
捕获产物的 beads	+
Nuclease-free Water	45
Total	100

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。

- 将 3.3.5 步骤 4 的装有 scATAC Beads SD 的离心管短暂离心后置于 1.5 mL 规格磁力架（与上节相同）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 1 mL 移液器加入 1 mL Wash Buffer A，用移液器（1 mL 量程）轻轻吹打 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。
- 重复步骤 2，从磁力架上取下离心管，用 1 mL 移液器加入 1 mL Wash Buffer A，用移液器（1 mL 量程）轻轻吹打 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。
- 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 scATAC Beads SD。
- 迅速取下离心管，加入 100 μ L 连接反应体系，上下颠倒混匀。
- 置于旋转仪上，室温反应 60 min。
- 连接反应结束后短暂离心，置于磁力架上，待溶液澄清后小心移除上清，加入 100 μ L Transposition Stop Buffer 上下颠倒混匀，50 $^{\circ}$ C 静置 30 min。
- 反应结束后，带有产物的离心管短暂离心后置于 1.5 mL 规格磁力架（与上节相同）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 1 mL 移液器加入 1 mL Wash Buffer A，轻轻上下颠倒混匀。

3.4.2 PCR 扩增

1. 体系配置：提前室温解冻“scATAC Amplification Master Mix”，“scATAC index Primer Mix” 涡旋 10s 后短暂离心然后置于冰上，按照如下表格在冰上配制 PCR Mix，涡旋混匀并短暂离心。

注： *scATAC index Primer Mix*：可以根据需要更换不同的 *index*。

2. 将连接产物短暂离心，置于 1.5mL 规格磁力架上，待溶液澄清后小心移除上清。

组分	1 RXN (μL) $\times 1$	1 RXNs (μL) $\times N$
scATAC Amplification Master Mix	200	N*200
scATAC index Primer Mix*	24	N*24
Nuclease-free Water	176	N*176
Total	400	N*400

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 8 联排管中，每管分装液体体积为 50 μL 。

4. 盖好 8 联排管管盖，置于 PCR 仪中进行扩增，设置热盖温度 105 $^{\circ}\text{C}$ ，反应体积 50 μL ，PCR 程序见下表。

注： PCR 程序结束后，可将样品在 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存 48h 和 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存一周，或者直接进行 scATAC 文库产物纯化。

Step	Temperature	Time
1	72 $^{\circ}\text{C}$	0:03:00
2	95 $^{\circ}\text{C}$	0:03:00
3 cycle=16	98 $^{\circ}\text{C}$	0:00:10
		60 $^{\circ}\text{C}$
4	72 $^{\circ}\text{C}$	0:01:00
5	4 $^{\circ}\text{C}$	Hold

3.4.3 产物纯化

1. Ampure XP 纯化磁珠（后简称磁珠）提前 30 min 从 4 $^{\circ}\text{C}$ 中取出，恢复室温。

注：磁珠使用前需充分涡旋振荡 15 s 混匀。

2. 将 PCR 扩增产物收集到 1.5 mL 离心管中，短暂离心，量取体积。加入 0.4×纯化磁珠（例如，量取的产物体积为 400 μL，则加入 $0.4 \times 400 = 160$ μL 体积的纯化磁珠）涡旋 15 s 混匀后，室温孵育 5 min，短暂离心，置于 1.5 mL 规格磁力架（与上节相同）上静置 5 min；至液体透明澄清，小心吸取 540 μL 上清液至新的 1.5 mL 离心管中，加入 308.6 μL 体积的纯化磁珠（吸取上清体积为 540 μL，则加入 $(1.2 - 0.4) \times 540 \times 100 / 140 = 308.57$ μL 体积的纯化磁珠）涡旋 15 s 混匀后，室温孵育 5 min，短暂离心，置于 1.5 mL 规格磁力架（与上节相同）上静置 5 min；至液体透明澄清，小心吸除上清液至新的 1.5 mL 离心管中，暂留

注：磁珠比较粘稠，准确移取相应的体积，否则可能导致分选的片段长度与预期不一致。

3. 保持离心管始终处于磁力架上，加入 800 μL 新配制的 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，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 2 min（不要超过 5 min）。

6. 取下离心管，加入 20 μL Buffer EB（也可以使用无核酸酶水代替），用移液器（18 μL 量程）吹打 15 次以上混匀磁珠，室温孵育 5 min，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：将样品于 4°C 可保存 72 h，在 -20°C 可保存一周，或者可直接进行定量。

3.4.4 扩增纯化产物质检

1. 取适量（建议 1 μL）样品进行 scATAC 文库浓度和片段大小检测。

推荐使用 Qubit 进行 scATAC 文库浓度检测，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 3-4-4，合格 ATAC 文库满足以下条件：文库峰型具有明显的 ATAC 产物的指峰形状，在 220 bp、400 bp、600 bp 均有峰型，不同类型样本峰型可能会存在差异。

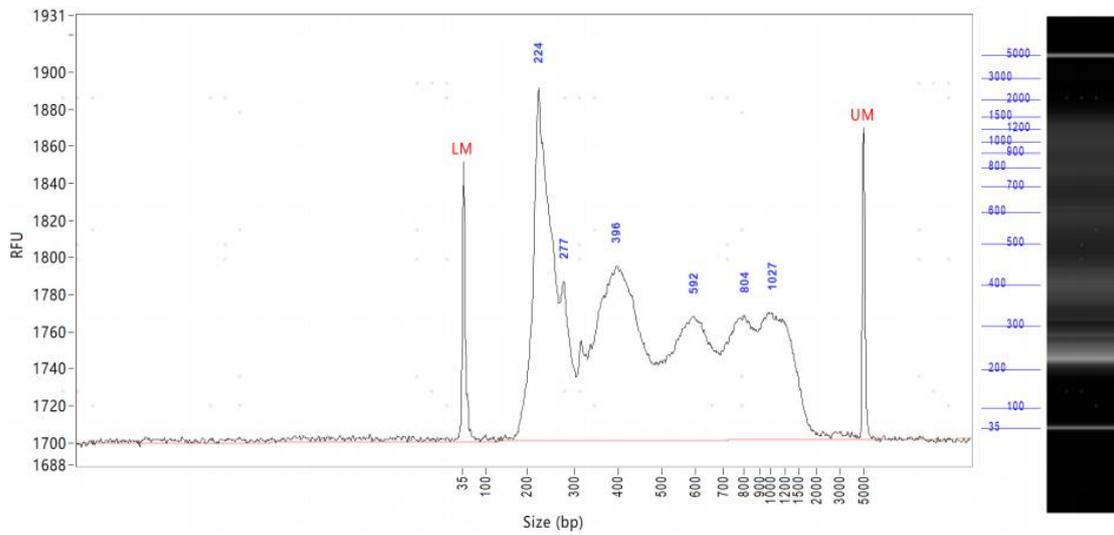


图 3-4-4 ATAC 文库质检图

质控等级	评判标准	对应处理
合格	Qubit 检测总量>60 ng，且质检文库指峰： 在 220 bp、400 bp、600 bp 左右均有峰型	建议直接进行测序
风险	Qubit 检测总量>30 ng，质检文库指峰： 在 220 bp、400 bp、600bp 左右指峰不明显	尝试风险测序
不合格	不满足合格/风险质控标准	不建议进行测序

附录 1：®组织保存液说明书

1. 用途

用于 2 - 8℃ 储存和运输活性生物组织样本，本品可保存新鲜组织长达 72 h，组织内细胞活性高达 70% 以上。

2. 性状

无色至浅黄色澄清水溶液，含钠盐、钾盐、氨基酸、维生素、葡萄糖等。PH7.3 - 7.6，无细菌、真菌和支原体，内毒素 < 0.3 EU/mL。

3. 储存

避光保存。4℃ 储存，自生产之日起可保存 2 个月。-20℃ 保存，自生产之日起可保存 1 年。

4. 使用方法

1) 1) 准备新鲜组织：确保新鲜组织无微生物污染，去除坏死组织和残留的血液，将组织修剪成 0.5 cm³ 为佳。组织块太大会影响细胞活性。

2) 2) 准备组织保存液：使用前将组织保存液预冷至 2 - 8℃，生物样本的运输和保存都应该保持在 2 - 8℃。

3) 3) 估算样本体积后，取至少 5 倍体积的本溶液，然后将组织浸泡在其中。

注：5 - 10 倍体积的组织保存液可运输保存活性组织 24 - 72 h。如果保存时间 < 6 h，可酌情降低组织保存液体积，但必须保证组织块被充分浸没。

4) 4) 保存后的组织可直接用于后续实验和研究。由于本品含抗氧化剂，为防止受到抗氧化剂干扰，组织样本可用生理盐水或磷酸盐缓冲液浸润清洗 2 - 3 次。

5. 安全性说明

本产品仅用于体外科学研究。

附录 2：组织解离液说明书

1. 原理

本产品是由多种作用机制不同的消化酶组成的混合酶，通过对组织中的间质成分和细胞间连接的消化作用，从而快速的将组织解离成单细胞悬液并保持细胞的活性。

2. 特点

该产品用于将新鲜组织分散为单个活细胞，适用于多种正常及肿瘤组织。整个过程仅需 30 - 60 min，高效便捷，所用耗材是常见细胞培养耗材；操作过程简单，无需特殊仪器设备，普通实验室均可进行，具有很强的实用性；所获的单细胞活性可达 90%，解决了制备分离单细胞的痛点问题。

3. 用途

将新鲜组织解离为单个活细胞。

4. 性状

无色至浅黄色澄清水溶液。

5. 储存和储存

注意避光，-20°C 保存，自生产之日起可保存 3 个月。

6. 用户自备仪器设备和试剂耗材

试剂	耗材	仪器设备
组织解离液	巴氏德吸管（5mL）	普通倒置光学显微镜
台盼蓝染液或荧光染料	眼科剪/眼科镊	高速冷冻离心机
PBS 缓冲液	40 μm 无菌滤网	恒温振荡摇床
HBSS 缓冲液	1.5 mL 离心管	细胞计数仪（可选）
红细胞裂解液	15 mL/50 mL 离心管	移液器
0.04%台盼蓝染液	6 cm 无菌培养皿	细胞计数板

7. 使用方法

7.1 组织清洗与前处理：取新鲜组织 100 mg，用 1×HBSS 缓冲液清洗 3 次，去掉多余水分后

转移至 1.5 mL 离心管中，加入少量消化液，在冰上将组织用眼科剪剪碎至肉糜状，此时加入 1 mL 消化液后再用巴氏吸管将组织匀浆转移至 15 mL 低吸附离心管消化，最后根据组织重量按 50 mg/mL 的量补足消化液。

7.2 组织解离：将恒温摇床提前预热至 37°C，将装有组织的 15 mL 低吸附离心管水平放置于摇床中，设置转速 180 rpm，消化 15 - 30 min，每隔 15 min 镜检观察细胞解离情况，判断是否继续消化。

注：消化时长与组织类型、剪碎程度有关。

7.3 消化 15 min 后，取 10 μ L 细胞悬液进行台盼蓝染色，在显微镜下观察细胞，如果细胞悬液达标则停止消化。

以下条件都满足，即为达标的细胞悬液：

- a) 15 mL 低吸附离心管中正常组织块占比低于 5%；
- b) 显微镜下未完全解离的组织或细胞团状物占比低于 5%；
- c) 显微镜下一个视野内死细胞占比低于 5-10%。

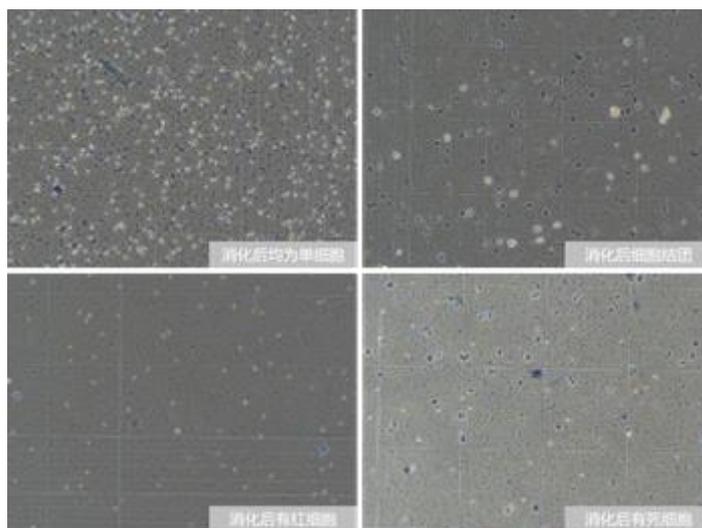


图 1-1：消化后均为单细胞；图 1-2：消化后细胞结团；图 1-3：消化后有红细胞；图 1-4：消化后有死细胞。

7.4 转移过滤：将解离达标的细胞悬液通过 40 μ m 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，确保将细胞全部转移，用 PBS 将过滤后的悬液体积定容至 15 - 25 mL。

7.5 离心重悬：将上步获得的细胞悬液离心，350 rcf，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。

7.6 过滤镜检：取 10 μ L 细胞悬液进行台盼蓝染色，镜检观察细胞状态。

7.7 可选步骤：

- 1) 如死细胞或杂质较多，可选用商业去死细胞试剂盒进行去除。
- 2) 如红细胞较多，可选用商业红细胞裂解液裂解去除。

7.8 细胞洗涤：若无需裂红处理可将细胞悬液转移至 15 mL 离心管中进行清洗，用预冷的 1 \times 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 300 rcf 离心 5 min，去上清。最终加 2 mL 左右 PBS 缓冲液重悬细胞沉淀，镜检计数。

7.9 细胞计数：根据镜检观察的细胞量，用适当体积的 PBS 重悬细胞沉淀，取 10 μ L 细胞悬液进行台盼蓝或荧光染色，用血球计数板或荧光计数仪计算细胞浓度及活性。

8. 安全性说明

本产品仅用于体外科学研究。

附录 3： DNaseI 处理细胞说明书

1. 细胞数量

推荐投入 5×10^5 - 1×10^6 细胞进行细胞核的提取操作。离心、提取过程的镜检等操作都会造成细胞核的损失，初始细胞量投入过少可能造成后续细胞核量不足的情况；细胞初始投入量过高影响裂解液的效率，可能会造成裂解不均一。

2. 细胞活性

推荐使用活性超过 90% 的细胞进行后续的实验，细胞活性超过 95% 最佳。当细胞活性在 75%~85% 时，可以使用 DNaseI 进行处

3. DNaseI 处理

3.1 首先按照下表配置 DNaseI 溶液，涡旋 10s 混匀并短暂离心，置于冰上备用。

组成	Stock	Final	1 mL
Tris-HCl (pH 7.4)	1 M	20 mM	20 μ l
NaCl	5 M	150 mM	30 μ l
Reaction buffer with MgCl ₂	10 \times	1 \times	100 μ l
DNaseI	1U/ μ l	0.1U/ μ l	100 μ l
Nuclease-free Water	-	-	750 μ l

3.2 取适量的细胞悬液离心弃上清后，加入 300 μ l 配置的 DNaseI 溶液，吹打混匀后置于冰上反应 5 min

3.3 反应结束后 300 rcf、4 $^{\circ}$ C 离心 10 min

3.4 弃上清，加入 1 mL PBS（含有 0.04% BSA）重悬细胞，300 rcf、4 $^{\circ}$ C 离心 10 min

3.5 弃上清 PBS 重悬测定细胞浓度。

附录 4：冻存组织提核方法

1. 冷冻组织提核注意事项

1.1 冻存组织称量方法: 在冰上, 冷冻组织样本放入 6 cm 的培养皿中, 取出 30 mg - 50 mg 冷冻组织装入 1.5 mL EP 管中

注: 冷冻组织样本提核组织重量不宜过度 (>100mg), 导致细胞核悬液杂质比例过高。

1.2 冷冻提核操作尽可能在冰上操作, 保持低温的环境

2. 用户自备仪器设备和试剂耗材

试剂	耗材	仪器设备
0.1×ATAC Nuclei Isolation Buffer	眼科剪/眼科镊	荧光显微镜
Nuclei Wash buffer	研磨杵	高速冷冻离心机
PBS 缓冲液	40 μm、70 μm 无菌滤网	细胞计数仪/细胞计数板
DAPI 染色	1.5 mL/15 mL/50 mL 离心管	移液器
0.04%台盼蓝染液	6 cm 无菌培养皿	不同规格无菌&无核酸酶吸头

3. 冷冻组织提核操作步骤

3.1 称取适量 (30~50 mg) 冻存组织于 1.5 mL 的离心管中。

3.2 向装有适量冻存组织的 1.5 mL 离心管中加入 100 μL 0.1× ATAC Nuclei Isolation Buffer, 使用研磨杵研磨 15 次, 使其成匀浆状态, 再加入 400 ul 0.1× ATAC Nuclei Isolation Buffer 混匀后冰上孵育 5 min。

3.3 孵育结束后, 使用大孔枪头吹打混匀 10 次, 冰上继续孵育 10 min。

3.4 孵育结束后, 加入 500 μL 预冷的 Nuclei Wash buffer, 吹打 5 次充分混匀后, 使用 70 μm 滤膜进行过滤除杂。

注: 70 μm 滤膜可提前使用 Nuclei Wash buffer 进行润洗过滤缓慢可采用多个 70 μm 滤膜, 建议每次过滤的体积不要太多, 过滤完成后可用预冷的 Nuclei Wash buffer 冲洗滤膜

3.5 使用 40 μm 滤膜进行二次过滤除杂。

注: 70 μm 滤膜可提前使用 Nuclei Wash buffer 进行润洗过滤缓慢可采用多个 70 μm

滤膜,建议每次过滤的体积不要太多,过滤完成后可用预冷的 Nuclei Wash buffer 冲洗滤膜

(可选步骤)吸取少量过滤后液体进行镜检(DAPI 染色、AOP1 染色或者台盼蓝染色),

记录细胞核含量、提核质量和杂质含量

3.6 500 rcf、4°C、5 min 离心, 弃上清。

3.7 使用适量的预冷 PBS 重悬细胞核, 吸取少量的细胞核进行 DAPI 染色, 镜检观察细胞核质量和杂质含量。

注: 可根据细胞沉淀量加入适量的预冷 PBS

3.8 DAPI 染色镜检后, 细胞杂质符合要求(细胞杂质较少)后, 吸取少量细胞核进行 APO1 染色、计算。

3.9 细胞核提取质控标准

质控等级	评判标准	对应处理
合格	细胞核外形规整未出现裂解过度导致细胞核破裂; 细胞核悬液杂质比例<10%; 细胞核浓度>3.0×10 ⁶ nuclei/mL	建议直接进行转座
风险	不满足“合格/不合格”任一评级条件	尝试风险转座
不合格	细胞核浓度<3.0×10 ⁶ nuclei/mL, 细胞核外形破裂比例>30%	重新提核

3.10 若细胞杂质较多可采用除杂液除杂或者低速离心除杂(选做)。

注: PBS 重悬后的细胞核浓度不低于 3×10⁶ /mL

1) 除杂液除杂:

以下以小鼠冻存脑进行除杂液除杂说明: 使用 3.5 mL 预冷 PBS 重悬细胞核, 加入 1.5 mL 除杂液工作液混匀后, 450 rcf、4°C、15 min 离心, 弃上清, 预冷 PBS 重悬, 重复步骤 3.7 和 3.8 镜检细胞核质量。

2) 低速离心除杂:

以下以小鼠冻存脑为例进行低速离心除杂说明: 使用 7 mL 预冷 PBS 重悬细胞核, 300 rcf、4°C、5 min 离心, 弃上清, 预冷 PBS 重悬, 重复步骤 3.7 和 3.8 镜检细胞核质量。

附录 5：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。

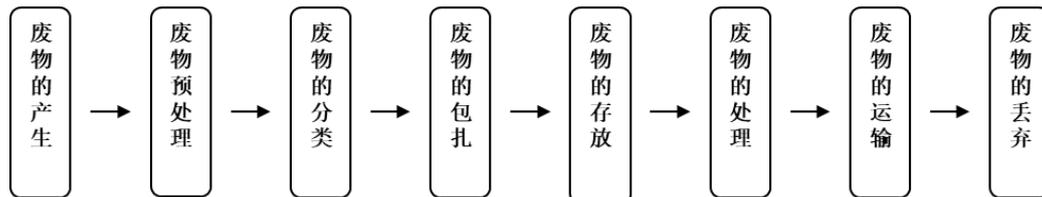


图 10-1 危险性废弃物管理工作守则流程图

● 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。

● 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。



附图 医疗废弃物处理

附录 6：常见问题与解答

1. scATAC-seq 的应用领域有哪些？

答：在许多研究领域中有广泛的应用，包括发育生物学、免疫学、神经科学和肿瘤学等，可以获得染色质可及性图谱、细胞类型聚类图、差异可及性区域和基因调控网络等信息，这些结果可以帮助研究人员理解细胞类型、基因调控和细胞状态的变化等。

2. 如何解读和分析 scATAC-seq 数据？

答：数据质控、片段峰值检测、聚类分析、差异分析和功能注释等。

3. scATAC-seq 的细胞质控要求？

答：细胞活性大于 85%，细胞推荐投入提核透化的数量是 5×10^5 cell，如果细胞偏少，推荐细胞投入量至少 $>1 \times 10^5$ cell。

4. 组织解离液用量如何选择？

答：建议 50mg 组织使用 1mL 的组织解离液。

5. 细胞提核质量会影响 ATAC 哪些指标？

答：细胞提核避免细胞裂解过度，出现细胞核破裂；或者细胞裂解不充分，细胞活性 $>50\%$ ；当细胞核破裂出现过度裂解，会导致文库 High-quality fragments in cells 偏低，裂解不充分时会导致文库的细胞检出数偏低。

6. 解离时间太长对细胞活性的影响？

答：解离时间太长，会降低细胞活性，影响细胞状态。使用本产品推荐解离时间 15-30min，最长不建议超过 1h。

7. 处理细胞悬液过程中哪些步骤镜检比较好？

答：37°C 解离 15min 后，可镜检观察细胞状态和细胞量；组织块解离完后，可镜检观察细胞状态和细胞量；过滤后可镜检观察细胞状态，细胞量，细胞碎片含量和红细胞含量等；计数时镜检观察细胞活性，细胞浓度等。

8. scATAC 文库测序模式是怎么样的？

答：推荐测 PE150，i5 测 28bp，i7 测 8bp，cell barcode 信息在 i5 端，i5 端信息需要保留。

9. scATAC 文库推荐测序量是多少？

答：一般推荐测 40 G。



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）