

**MobiuSCOPE™ Single Cell Full Length RNA Library Kit Cell
for Matrix NEO**

单细胞全长转录组建库试剂盒（SD）用户手册·自动版

本手册适用于以下产品：

目录号	产品名称	规格
45034251	MobiuSCOPE™ Single Cell Full Length RNA Library Kit for NEO	4 RXNs
45034221	MobiuSCOPE™ Single Cell Full Length RNA Library Kit for NEO	16 RXNs

历史版本信息

版本信息	修改内容
2025/03	1. 出版
2025/04	2. 仪器界面更新、产品更新

版权说明

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

目录

1. 基本信息	- 1 -
1.1 产品概述.....	- 1 -
1.2 产品组成.....	- 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 -
4.1 细胞和微流控芯片准备.....	- 9 -
4.2 准备 Lysis Buffer 和 FLRNA Barcoding Beads.....	- 11 -
4.3 仪器操作.....	- 12 -
5. 反转录 cDNA 扩增	- 16 -
5.1 反转录.....	- 16 -
5.2 cDNA 扩增.....	- 17 -
5.3 cDNA 产物纯化.....	- 19 -
5.4 cDNA QC.....	- 20 -
6.3 端转录组文库构建	- 22 -
6.1 片段化.....	- 22 -
6.2 接头连接.....	- 23 -
6.3 接头连接后产物纯化.....	- 24 -
6.4 PCR 富集.....	- 25 -
6.5 扩增产物片段分选.....	- 26 -

6.6 文库质检	- 28 -
7.5 端 cDNA 制备	- 30 -
7.1 cDNA 环化	- 30 -
7.2 酶切	- 31 -
7.3 酶切产物一轮扩增	- 32 -
7.4 酶切产物二轮扩增	- 34 -
8.5 端转录组文库构建	- 38 -
8.1 片段化	- 38 -
8.2 接头连接	- 39 -
8.3 接头连接后产物纯化	- 40 -
8.4 PCR 富集	- 41 -
8.5 扩增产物片段分选	- 42 -
8.6 文库质检	- 44 -
附录 A 技术原理	- 46 -
A1 单细胞分选、mRNA 捕获、反转录及 PCR 富集	- 46 -
A2 3 端转录组文库构建	- 47 -
A3 5 端文库构建原理	- 48 -
A4 3 端和 5 端文库结构	- 49 -
附录 B cDNA 含量少于 150ng 解决方案 (cDNA 再扩增方案)	- 50 -

1. 基本信息

1.1 产品概述

MobiusSCOPE 单细胞全长转录组文库试剂盒可与 Singleron Matrix NEO® 自动化单细胞测序文库构建系统配套使用。MobiusSCOPE 单细胞全长转录组文库试剂盒提供了一种在高通量单细胞水平上检测全长转录本基因表达的方法。通过带有 polyT 尾的磁珠捕获 mRNA，磁珠上带有 barcode 和 UMI，barcode 用来区分单细胞，UMI 用来对转录本进行定量，捕获完成后再经过反转录和 PCR 扩增获得 cDNA，获得的 cDNA 一部分用于 3 端转录组文库构建，另一部分通过环化和富集获得 5 端转录组文库，通过对两个文库的测序数据的联合分析获得全长转录组的基因表达情况。



1.2 产品组成

以下适用于：

MobiusSCOPE Single Cell Full Length RNA Library Kit for NEO (4 RNXs)

BOX 1: Single Cell Full-length transcriptome Amplification NEO Chip & Library Construction

Reagents

收到试剂盒后，请及时保存在-25~-15℃。

组分	SD		管盖颜色
	数量	体积	
Lysis Buffer, Stock	1	1500μL	绿色
100 mM DTT	1	400μL	绿色
RNase Inhibitor	1	50μL	绿色
RT master Mix	2	400μL	紫色
Reverse Transcriptase	2	50μL	紫色
TS Primer	2	50μL	紫色
Amplification Master Mix	1	4 mL	白色
Amplification Enzyme	1	160μL	透明
Circle master mix	2	30μL	亮紫色
Cyclicase	1	10μL	亮紫色
G Primer Mix	2	20μL	亮紫色
FLRNA Mix1	1	10μL	亮绿色
FLRNA Mix2	1	10μL	亮绿色
Purification Beads Wash Buffer	4	1.5 mL	透明
Fragmentation Buffer V3	1	135μL	橙色
Fragmentation Enzyme Mix V3	4	6μL	橙色
1× TE	1	800μL	橙色
Ligation Mix	1	576μL	蓝色
Ligation Booster	1	20μL	蓝色
Adapter	1	50μL	蓝色
Library Amp Mix V3	2	480μL	白色

Indexing Primer Mix 1	1	30 μ L	白色
Indexing Primer Mix 2	1	30 μ L	白色
Indexing Primer Mix 3	1	30 μ L	白色
Indexing Primer Mix 4	1	30 μ L	白色
TE Adapter Mix 1	1	30 μ L	白色
TE Adapter Mix 2	1	30 μ L	白色
TE Adapter Mix 3	1	30 μ L	白色
TE Adapter Mix 4	1	30 μ L	白色

BOX 2: NEO Chip SD & FLRNA Barcoding Beads

收到试剂盒后，请及时保存在 2~8 $^{\circ}$ C。

组分	SD		管盖颜色
	数量	体积	
FLRNA Barcoding Beads	2	1.8 mL	黑色
Wash Buffer A	2	7 mL	白瓶
Wash Buffer B	2	1.8 mL	白色
NEO Chip SD	4	/	自封袋 (透明)

以下适用于：

[MobiusSCOPE Single Cell Full Length RNA Library Kit for NEO \(16 RXNs\)](#)

Box 1: NEO-Chip (NEO)

收到试剂盒后，请及时保存在 2~35 $^{\circ}$ C。

组分	SD
	数量
NEO-Chip	16

Box 2: FLRNA Barcoding Beads SD

收到试剂盒后，请及时保存在 2~8 $^{\circ}$ C。

组分	SD		管盖颜色
	数量	体积	
FLRNA Barcoding Beads SD	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 Full-length transcriptome Amplification SD

收到试剂盒后，请及时保存在-25~-15℃。

组分	SD		管盖颜色
	数量	体积	
Lysis Buffer, Stock	2	1500μL	绿色
RNase Inhibitor	1	300μL	绿色
100 mM DTT	1	400μL	绿色
RT Master Mix	2	1500μL	紫色
Reverse Transcriptase	1	400μL	紫色
TS Primer	1	250μL	紫色
Amplification Master Mix	2	4mL	白色
Amplification Enzyme	2	190μL	透明
G Primer mix	1	100μL	淡紫色
Circle master mix	2	100μL	淡紫色
Cyclicase	1	10 μL	淡紫色
FLRNA Mix 1	3	10μL	淡绿色
FLRNA Mix 2	3	10μL	淡绿色
Purification Beads Wash Buffer	2	7.5 mL	白色

Box 4: FLRNA 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	2	135μL	橙色
Fragmentation Enzyme Mix V3	2	40μL	橙色
1×TE	2	800μL	橙色
Ligation Mix	2	576μL	蓝色
Ligation booster	2	20μL	蓝色
Adaptor	2	50μL	蓝色
Library Amp Mix V3	2	480μL	白色

Box 5: FLRNA 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
TE Adapter Mix1 (TAAGGCGA)	1	30 μL	白色
TE Adapter Mix2 (CGTACTAG)	1	30 μL	白色
TE Adapter Mix 3 (AGGCAGAA)	1	30 μL	白色
TE Adapter Mix 4 (TCCTGAGC)	1	30 μL	白色
TE Adapter Mix 5 (GGA CTCT)	1	30 μL	白色
TE Adapter Mix 6 (TAGGCATG)	1	30 μL	白色
TE Adapter Mix 7 (CTCTCTAC)	1	30 μL	白色
TE Adapter Mix 8 (CAGAGAGG)	1	30 μL	白色

注意:

- 按照各自的保存温度存放试剂。
- FLRNA Barcoding Beads SD 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
- DynaMag™-2 磁力架/12321D/Thermo 或其他兼容 1.5mL 离心管的磁力架

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⁺)
- AOPI 染液或 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 Buffer EB
- 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
Pre-PCR station	细胞准备	0.5h-1h	
	试剂添加		
	仪器运行	0.5-1h	Stop, -80°C ≤ 48h
	完成制备和收样		
Post-PCR station	反转录	1.5-2h	可 4°C 过夜
	cDNA 扩增	1.5-2h	Stop, 4°C ≤ 72h or -20°C ≤ 7days
	3 端转录组文库建库	3h	Stop, -20°C or -80°C ≤ 3months
	环化酶切	3h	
	环化酶切产物一轮扩增	1.5-2h	Stop, 4°C ≤ 72h or -20°C ≤ 7days
	环化酶切产物二轮扩增	1.5-2h	Stop, 4°C ≤ 72h or -20°C ≤ 7days
	5 端转录组文库建库	3h	Stop, -20°C or -80°C ≤ 3months
	全流程时长		16-19h

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”。这些步骤包括细胞核提取、单细胞核分离和 mRNA 捕获、反转录。对于 RNA 相关的工作，用 RNase Away(或同类产品)清洁所有工作台面和移液器。佩戴适当的口罩和实验室手套，以避免污染和 RNA 降解。

设立第二个实验区(Post-PCR)，进行 cDNA 扩增、纯化和 QC，以及文库制备和 QC。

4.1 细胞和微流控芯片准备

准备材料：

- 微流控芯片
- 单细胞悬液



自备材料：

- PBS 缓冲液;
- 10% Tween-20;
- 无水乙醇;
- 不同量程单通道移液器;
- 15cm X 15cm 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. 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。

NEO-chip SD :

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

3. 取出微流控芯片确认进样口与出样口，如图 1.

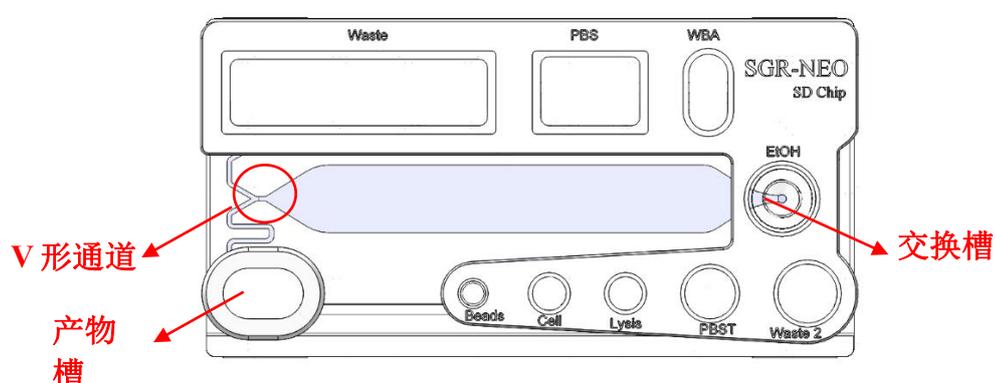


图 1. 微流控芯片示意图

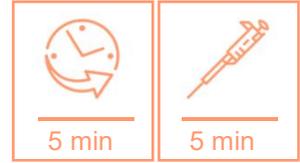
5. 将微流控芯片置于干净的培养皿上，用 200 μ L 的移液器吸取无水乙醇从交换槽注入芯片，确保无水乙醇注满芯片通道且无白色气泡。

试剂名称	芯片类型	体积
无水乙醇	NEO Chip SD	105 μ L

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。

2) 如果观察到通道内有白色气泡，请抽出无水乙醇，并注入新无水乙醇以排除气泡。

4.2 准备 Lysis Buffer 和 FLRNA Barcoding Beads



准备材料:

- Lysis Buffer, Stock;
- 100mM DTT;
- RNase Inhibitor;
- FLRNA Barcoding Beads。

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. 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) $\times 1$	4 RXNs (μL) $\times 4.4$
Lysis Buffer, Stock	138.7	610.28
100mM DTT	7.5	33
RNase Inhibitor	3.8	16.72
Total	150	660

2. 将 FLRNA Barcoding Beads 用移液器(1mL 量程)轻柔吹打 15 次混匀后，吸取 900 μL FLRNA 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。
3. 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。
4. 取下离心管，用 PBS 重悬定容至 80 μL 。若 1h 内使用，可放置在常温待用；若超过一小时不用，置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱待用。

4.3 仪器操作

准备材料：

- Singleron Matrix NEO® ；
- Wash Buffer A（白色）；
- Lysis Mix、FLRNA Barcoding Beads（来自 4.2 步骤）；
- 微流控芯片（NEO-chip SD）；
- 细胞悬液（来自 4.1 步骤）。

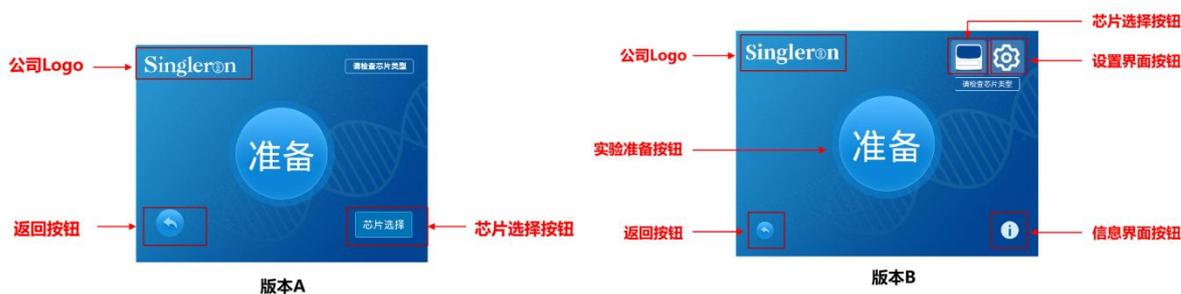
○

自备材料：

- PBS 缓冲液；
- 不同量程单通道移液器；
- 1.5mL 离心管。

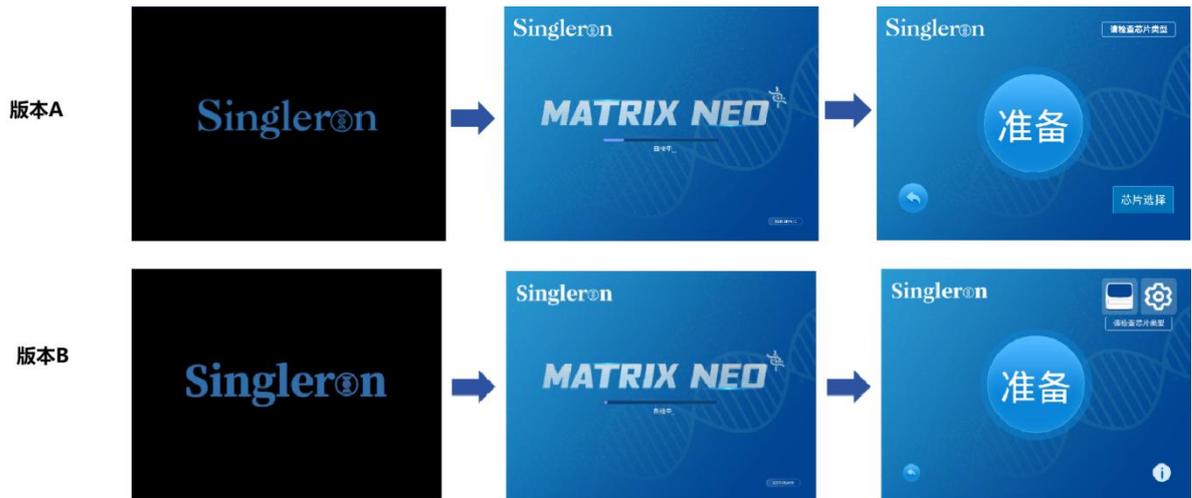
1. 准备界面介绍

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的芯片选择项，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。



SD 芯片加样体积:

试剂名称	体积
FLRNA 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“4.2 准备 Lysis Buffer 和 FLRNA 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 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。

5. 反转录 cDNA 扩增

5.1 反转录

准备材料：

- Wash Buffer A;
- Wash Buffer B;
- RT Master Mix;
- TS Primer;
- RNase Inhibitor;
- Reverse Transcriptase;
- 上一步骤收集的 FLRNA Barcoding Beads。



自备材料：

- Nuclease-free water;
- 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) \times 1	4 RXNs (μL) \times 4.4
RT Master Mix	120	528
Nuclease-free water	45	198
TS Primer	10	44
RNase Inhibitor	5	22
Reverse Transcriptase	20	88
Total	200	880

2. 将收集 FLRNA 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 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 FLRNA Barcoding Beads。
5. 迅速取下离心管，加入 200 μ L 配好的 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）。

5.2 cDNA 扩增

准备材料：

- Amplification Master Mix；
- G Primer Mix；
- Amplification Enzyme；
- 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；
- Nuclease-free water；
- 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℃。

热盖温度 105℃		反应体系 50μL	
步骤	温度	时间	
1	95 °C	3 min	
	98 °C	20 sec	
2	65 °C	45 sec	
	Cycles = 4 72 °C	3 min	
3	98 °C	20 sec	
	67 °C	20 sec	
Cycles = 10	72 °C	3 min	
	72 °C	5 min	
4	72 °C	5 min	
5	4 °C	Hold	

2. 提前室温解冻 “Amplification Master Mix”、“G 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	4 RXNs (μL) ×4.4
Amplification Master Mix	172	756.8
G Primer Mix	3.2	14.08
Nuclease-free water	216.8	953. 92
Amplification Enzyme	8	35.2
Total	400	1760

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 FLRNA Barcoding 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 °C保存一周，或者直接进行 cDNA 扩增纯化。

5.3 cDNA 产物纯化

准备材料：

- 上一步扩增后的 cDNA。



自备材料：

- 1.5mL 离心管；
- 无水乙醇；
- 无核酸酶水；
- Buffer EB；
- 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：

- 1、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。
- 2、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。
2. 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。
3. 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（或 2mL）离心管中，暂留。

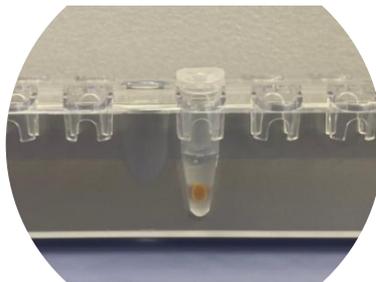


图 2. AMPure Beads 在磁力架上吸附示意图

4. 保持离心管始终处于磁力架上,加入 800 μ L Purification Beads Wash Buffer, 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 (或 2mL) 离心管中, 暂留。
5. 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。
6. 重复步骤 5, 共计漂洗 2 次。
7. 取下离心管, 短暂离心, 再次置于磁力架上, 吸去多余酒精, 开盖晾干约 2min(不要超过 5min)。
8. 取下离心管, 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。
9. 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 $^{\circ}$ C 保存 72h, 在-20 $^{\circ}$ C可保存一周, 或者可直接进行 cDNA 扩增纯化后的 QC 和定量。

5.4 cDNA QC



准备材料:

- cDNA (来自 5.3)。

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 1 μ L 纯化后的 cDNA 产物, 用 Qubit 4.0 荧光定量仪进行浓度定量。
2. 取约 5ng cDNA, 用 Agilent Fragment Analyzer 5200 进行片段分布分析。
3. 合格的 cDNA 应同时满足以下几个条件: 主峰片段大小应在 900-2000bp 左右; 1000bp-5000bp 占比大于 15%; 300bp 以下片段占比小于 40%。cDNA 评级分布见下表。(若在满足“合格”类条件下同时存在基线上调或拖尾严重情况, 评级评定为“风险”)

质控等级	评判标准	对应处理
合格	Qubit 检测总量 > 30ng, 质检主峰 900bp-2000bp 之间, 1000bp-5000bp 占比>15%, 300bp 以下片段占比<10%	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 3 的“合格”要求仍可直接建库。

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

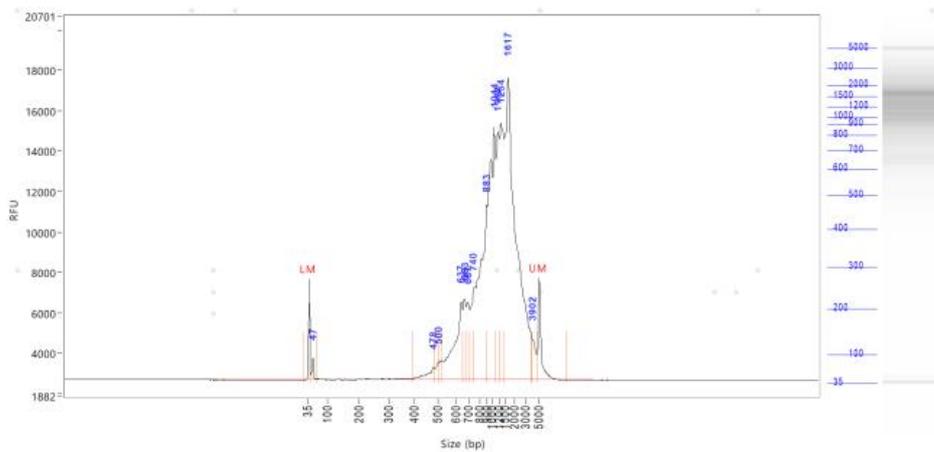


图 3. cDNA 片段分布示意图

6.3 端转录组文库构建

6.1 片段化



准备材料:

- Fragmentation Buffer V3;
- Fragmentation Enzyme Mix V3 ;
- 1×TE;
- Step 5.4 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 35 μ L，并使 PCR 仪热盖保持在 75 $^{\circ}$ C。

热盖温度: 75 $^{\circ}$ C		反应体积: 35 μ L
步骤	温度	运行时间
1	37 $^{\circ}$ C	10 min
2	65 $^{\circ}$ C	30 min
3	4 $^{\circ}$ C	Hold

2. 室温解冻 Fragmentation Buffer V3，确保完全融化，涡旋混匀（5–8 秒）并短暂离心后冰上备用；
如果看到沉淀，涡旋混匀至沉淀消失，溶液变澄清。
3. 使用前将 Fragmentation Enzyme Mix V3 涡旋振荡（5–8 秒）并瞬离，置于冰上备用。
4. 按照以下建议的 cDNA 模板投入量进行建库：
 - ① cDNA 总量大于 300ng 时，投入 50ng 进行建库。
 - ② cDNA 总量小于 300ng 时，选择 10ng 投入量进行建库。
 - ③ 建议 cDNA 预留二次建库的量。
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)
Diluted cDNA (10ng 或 50ng)	Variable
1 X TE	Variable
Fragmentation Buffer V3	7
Fragmentation Enzyme Mix V3	2
Total	35

- 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。
- 完成反应后立即进行下一步接头连接。

6.2 接头连接



准备材料：

- Ligation Mix;
- Ligation Booster;
- Adaptor;
- Step 6.1 的片段化产物。

- 提前按照下表设置接头连接 PCR 程序，反应体系 $70\mu\text{L}$ ，并关闭 PCR 仪热盖加热功能，若 PCR 仪无此功能，将热盖设置到最低温度。

热盖温度：OFF		反应体积： $70\mu\text{L}$
步骤	温度	运行时间
1	$20\text{ }^{\circ}\text{C}$	15 min
2	$4\text{ }^{\circ}\text{C}$	Hold

- 室温解冻 Adaptor，涡旋混匀后冰上备用。使用前将 Ligation Mix 涡旋混匀，短暂离心后置于冰上备用。
- Ligation Mix 较粘稠，吸取时注意量取准确体积（多反应体系时建议 Adaptor 单独加入）。
- 将上一步反应的 PCR 管置于冰上，配制如下反应体系：

接头连接反应体系*：

组分	体积 (μL)
Fragmented cDNA	35
Ligation Mix**	30
Ligation booster	1
Adaptor	2.5
Total	68.5

*多反应体系时不建议配制成一个 *master mix*。

**Ligation Mix 比较粘稠，小心移液确保体积准确。

5. 涡旋混匀并瞬离。将反应管置于 PCR 仪中立即运行接头连接程序。

6.3 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)；
- Step 6.2 的接头连接产物。

自备材料：

- AMPure XP 纯化磁珠；
- 无水乙醇；
- PCR 仪；
- 不同量程单通道移液器；
- 无核酸酶 PCR 管；
- 磁力架/TND08-C-A/深圳拓能达 或 DynaMag™-PCR 磁力架/492025/Invitrogen。

注意：

- AMPure XP 纯化磁珠 (以下简称磁珠) 提前 30min 从 4℃ 中取出，恢复室温备用。
- 磁珠使用前需充分涡旋 15s 振荡混匀。
- 磁珠比较粘稠，应确保精确量取，缓慢加入，否则可能导致分选的片段长度与预期不一致。

- 离心管放置到磁力架上后不应再旋转，因此摆放时需确定离心管开盖方向，离心时，离心管开盖方向朝内放置。

1. 每个反应准备 0.5mL 80%乙醇和 25 μ L 0.1 X TE 溶液（将 1 X TE 与无核酸酶水以 1:10 稀释）。
2. 将产物 PCR 管短暂离心，用移液器测量体积，涡旋混匀磁珠，AMPure XP 纯化磁珠体积为 0.2x 产物总体积。（例如：片段化产物体积为 68.5 μ L，则应使用 $0.2 \times 68.5 = 13.7 \mu\text{L}$ AMPure XP 纯化磁珠，室温孵育 5min。）
3. 将 PCR 管短暂离心后置于 0.2mL 规格磁力架（磁力架/TND08-C-A/深圳拓能达，本小节磁力架同规格）上，使纯化磁珠与液体分离，待溶液澄清后（约 5min），小心移除上清至一个新的无核酸酶 PCR 管中，暂时留存。
4. 保持 PCR 管置于磁力架上，用 200 μ L 新鲜配制的 80%乙醇漂洗磁珠，室温孵育 30s，小心移除上清。
5. 重复步骤 4，总计漂洗 2 次。
6. 从磁力架上取下 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）。
7. 将 PCR 管从磁力架上取下，加入 17 μ L 0.1 \times TE，涡旋振荡 15s 混匀磁珠，室温孵育 5min。
8. 将 PCR 管短暂离心后置于磁力架上，使磁珠与液体分离，待溶液澄清后（约 5min），小心吸取 15 μ L 上清至新的灭菌 PCR 管中用于步骤 6.4 PCR 富集。

注意：此步骤结束后可以将样品于 4 $^{\circ}$ C 保存 72 小时，-20 $^{\circ}$ C 保存一周。

6.4 PCR 富集

准备材料：

- Library Amp Mix V3;
- Indexing Primer Mix;
- Step 6.3 的接头连接后纯化产物。

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。



组分	体积 (μL)
接头连接纯化后产物 (Step 6.3 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 富集程序, 并使 PCR 仪热盖保持在 105°C, 反应体积 50μL。

热盖温度: 105°C		反应体积: 50 μL	
时间	温度	运行时间	
1	98 °C	30 sec	
2 (循环数参见下表)	98 °C	10 sec	
	65 °C	75 sec	
3	65 °C	5 min	
4	4 °C	Hold	

3. 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

6.5 扩增产物片段分选

准备材料:

- 步骤 6.4 的 PCR 富集产物。



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;
- 无核酸酶 PCR 管;
- 1.5mL 离心管;

- 磁力架/TND08-C-A/深圳拓能达或 DynaMag™-PCR 磁力架/492025/Invitrogen。

注意:

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

1. 每个反应准备 0.5mL 80%乙醇。
2. 将 6.4 产物 PCR 管短暂离心，用移液器测量体积，涡旋混匀磁珠并吸取 25 μ L 加入至 50 μ L 产物中（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。
3. 将 PCR 管短暂离心后置于 0.2mL 规格磁力架（磁力架/TND08-C-A/深圳拓能达，本小节磁力架同规格）上静置，使纯化磁珠与液体分离，待溶液澄清后（约 5min），小心回收上清液至一个新的无菌 PCR 管中，丢弃纯化磁珠。
4. 涡旋振荡混匀磁珠并吸取 7.5 μ L 加入至上清中，涡旋振荡充分混匀，室温孵育 5min。
5. 将 PCR 管短暂离心后置于磁力架上，使纯化磁珠与液体分离，待溶液澄清后（约 5min），小心转移上清液置于新的 PCR 管暂时留存。
6. 保持 PCR 管始终处于磁力架上，加入 200 μ L 新鲜配制的 80% 乙醇漂洗磁珠。室温孵育 30s，小心移除上清。
7. 重复步骤 6，总计漂洗 2 次。
8. 从磁力架上取下 PCR 管，短暂离心，再次置于磁力架上，吸去多余酒精，开盖晾干磁珠 1min（不要超过 2min）。
9. 将 PCR 管从磁力架上取出，加入 20 μ L Buffer EB 洗脱。涡旋振荡 15s 混匀纯化磁珠，室温孵育 5min。
10. 将 PCR 管短暂离心并置于磁力架上，使纯化磁珠与液体分离，待溶液澄清后（约 5min）小心吸取 18 μ L 上清至新的灭菌 1.5mL 离心管中。

注意: 此步骤结束后可以将样品于-20℃或-80℃保存三个月。



6.6 文库质检

准备材料:

- Step 6.5 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;
 - 0.6mL PCR 透明薄壁管 (Qubit 定量, 推荐 Axygen)。
- 取 1 μ L 分选后的产物, 用 Qubit 4.0 荧光定量仪进行浓度定量。
 - 取约 5ng 分选后的产物, 用 Agilent Fragment Analyzer 5200 进行片段分布分析。
 - 理想的文库应符合以下标准:
 - 在分析区间设定为 300 bp 至 2000 bp 时, 主峰片段范围应在 400 bp 至 700 bp 之间。
 - 900 bp 至 1500 bp 之间的片段占比小于 10% 。
 - 300 bp 以下的片段占比小于 10% 。
 - 质控标准及处理方案如下:

质控等级	评判标准	对应处理
合格	Qubit 检测总量>100ng, 主峰 400bp-700bp 之间, 900bp-5000bp 占比<10%	建议直接上机测序
风险	Qubit 检测总量>50ng, 主峰 400b-700bp 之间, 900bp-5000bp 占 比 10%-20%	可尝试风险上机测序
不合格	Qubit 值<50ng, 主峰<400bp, 225bp-500bp 占比<30%	不建议上机测序

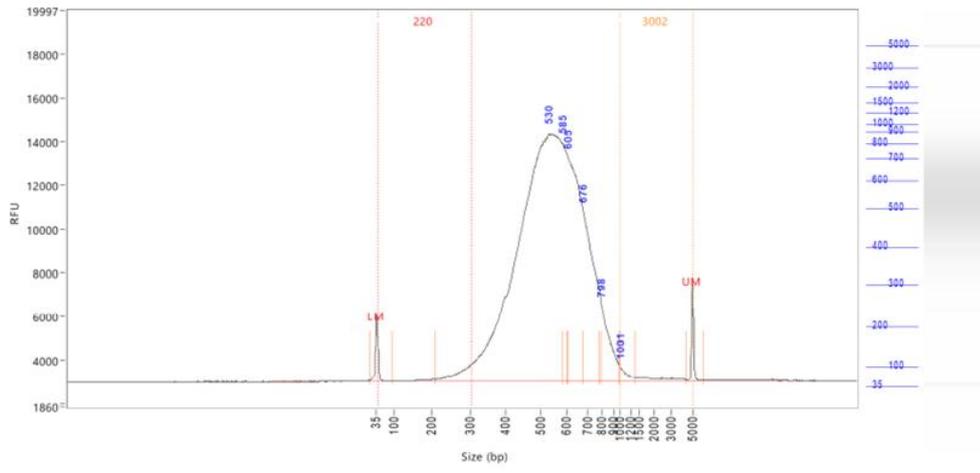


图 4. 文库质检图



7.5 端 cDNA 制备

7.1 cDNA 环化

准备材料:

- cDNA (Step 5.4 的 QC 合格的 cDNA 产物)。
- Circle master mix 。



自备材料:

- 0.2mL 无菌&无核酸酶 PCR 管;
- 无核酸酶水;
- 不同量程单通道移液器;
- 无核酸酶 PCR 管;
- DynaMag™-2 磁力架/12321D/Thermo 或其他兼容 1.5mL 离心管的磁力架。

1. 取 200 ng cDNA 产物，将 PCR 管置于冰上按照如下表格配制环化 mix，涡旋混匀并短暂离心。

组分	体积 (μL)
Circle master mix	10
cDNA (200ng)	Variable
Nuclease-free Water	Variable
Total	70

注意:

1) 建议预留 10–20ng cDNA，预防实验失败，可通过 cDNA 的再扩增重复整个实验流程。再扩增流程参考附录 B。

2) 若转录组得率低于 200ng，则留足转录组建库及 1) 中建议预留 cDNA 的量，剩余 cDNA 全部投入环化体系中，最低环化投入量不得低于 150ng，若低于 150ng，解决方法可参考附录 B。

2. 使用移液器轻柔充分混匀，短暂离心后将反应管置于 PCR 仪中，PCR 仪根据下表设置并运行反应，PCR 仪热盖 85℃:

热盖温度 85℃		反应体系 75 μL	
步骤	温度	运行时间	
1	50 °C	1:00:00	
2	75 °C	0:10:00	
3	4 °C	Hold	

7.2 酶切

准备材料：

- 环化产物（Step 7.1 的产物）；
- Cyclicase。

自备材料：

- 0.2mL 无菌&无核酸酶 PCR 管；
- Nuclease-free Water；
- 新鲜配制的 80%乙醇；
- 不同量程单通道移液器。

1. 环化后产物加入 Cyclicase 进行酶切。将 PCR 管置于冰上按照如下表格配制酶切体系。

组分	体积 (μL)
上一步环化产物	70
Cyclicase	0.5
Total	70.5

2. 使用移液器轻柔充分混匀，短暂离心后将反应管置于 PCR 仪中，PCR 仪根据下表设置并运行反应，PCR 仪热盖关闭：

热盖温度 关闭		反应体系 75μL	
步骤	温度	运行时间	
1	37 °C	30:00	
3	4 °C	Hold	

3. 产物纯化



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) 将 PCR 管中的液体，瞬离，计算体积，加入 1.3X 体积的 AMPure XP 纯化磁珠。例如：产物体积 70.5 μ L，则加入 70.5 X 1.3=91.65 μ L 的纯化磁珠。
- 2) 涡旋混匀后，室温孵育 5 min。短暂离心，置于磁力架上静置 5 min；至液体透明澄清，小心移除上清至新的 PCR 管中，暂留。
- 3) 保持 PCR 管始终处于磁力架上，加入 200 μ L 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，共计漂洗两次。
- 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 20 μ L Nuclease-free Water，涡旋混匀磁珠，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，无需定量。

注意: 此步骤结束后可以将样品于-20℃保存 24h。

7.3 酶切产物一轮扩增

准备材料:

- 酶切产物（Step 7.2 的酶切产物）；
- Amplification Master Mix；
- FLRNA Mix 1；
- Amplification Enzyme。



自备材料:

- 0.2mL 无菌&无核酸酶 PCR 管；
 - Nuclease-free water；
 - DynaMagTM-2 磁力架/12321D/Thermo 或其他兼容 1.5mL 离心管的磁力架；
 - Qubit 4.0 荧光定量仪；
 - 0.6mL PCR 透明薄壁管（Qubit 定量，推荐 Axygen）。
1. 20 μ L 酶切产物全部投入第一轮扩增的反应体系中，将 PCR 管置于冰上按照如下表格配制第一轮富集 PCR mix。

组分	体积 (μ L)
Amplification Master Mix	86
FLRNA Mix1	1.6
Nuclease-free water	88.4
Amplification Enzyme	4
酶切产物 (来自 step7.2)	20
Total	200

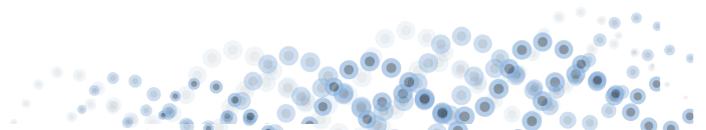
2. 使用涡旋仪轻柔充分混匀并短暂离心，一边吹打混匀，一边将 200 μ L 反应体系一边吹吸一边分装至 4 个 0.2 mL PCR 管中，每管 50 μ L。
3. 将 PCR 管置于 PCR 仪中，设置并运行如下反应程序，PCR 仪热盖 105 $^{\circ}$ C：

热盖温度 105 $^{\circ}$ C		反应体系 50 μ L	
步骤	温度	时间	
1	95 $^{\circ}$ C	3 min	
2 Cycles = 14	98 $^{\circ}$ C	20 sec	
	64 $^{\circ}$ C	20 sec	
	72 $^{\circ}$ C	3 min	
4	72 $^{\circ}$ C	5 min	
5	4 $^{\circ}$ C	Hold	

4. 产物纯化

注意：

- AMPure XP 纯化磁珠（以下简称磁珠）提前 30min 从 4 $^{\circ}$ C 中取出，恢复室温备用。



- 磁珠使用前需充分涡旋 15s 振荡混匀。
- 磁珠比较粘稠，应确保精确量取，缓慢加入，否则可能导致分选的片段长度与预期不一致。
- 离心管放置到磁力架上后不应再旋转，因此摆放时需确定离心管开盖方向，离心时，离心管开盖方向朝内放置。

- 1) 每反应准备 1 mL 80% 乙醇。
- 2) 将 PCR 扩增产物收集到 1.5 mL 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 200 μ L，则加入 $0.6 \times 200 = 120 \mu\text{L}$ 纯化磁珠。
- 3) 涡旋 15s 混匀后，室温孵育 5min。短暂离心，置于 1.5 mL 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 1.5 mL（或 2 mL）离心管中，暂留。
- 4) 保持 PCR 管始终处于磁力架上，加入 500 μ L 新配制的 80% 乙醇漂洗磁珠。室温孵育 30s，小心移除上清。
- 5) 重复 步骤 4，共计漂洗 2 次。
- 6) 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）。
- 7) 取下 PCR 管，加入 20 μ L nuclease-free water，涡旋混匀磁珠，室温孵育 5min。短暂离心后静置于磁力架上，至液体透明澄清。
- 8) 吸取上清并转移至新的 EP 管中，即为一轮扩增产物。

注意：此步骤结束后可以将样品于 4 $^{\circ}$ C 保存 72h，在 -20 $^{\circ}$ C 可保存 3 个月，或者可直接进 cDNA 扩增纯化后的 QC 和定量。

5. 扩增纯化产物质检

- 1) 取一份 1 μ L 第一轮扩增产物用 Qubit 4 荧光定量仪进行浓度测定。

7.4 酶切产物二轮扩增

准备材料：

- 第一轮扩增产物（Step 7.3 产物）；
- Amplification Master Mix；
- FLRNA Mix 2；



- Amplification Enzyme。

自备材料：

- 0.2mL 无菌&无核酸酶 PCR 管；
 - Nuclease-free water；
 - DynaMag™-2 磁力架/12321D/Thermo 或其他兼容 1.5mL 离心管的磁力架。
1. 取 20ng 第一轮扩增产物（step7.3）（不足 20ng，则将一轮富集产物全投进体系），将 PCR 管置于冰上按照如下表格配制第二轮扩增 PCR mix 。

组分	体积 (μL)
Amplification Master Mix	86
FLRNA Mix 2	1.6
Nuclease-free water	Variable
Amplification Enzyme	4
第一轮扩增产物 (step7.3)	20ng
Total	200

2. 使用涡旋仪轻柔充分混匀并短暂离心，一边吹打混匀，一边将 200μL 反应体系一边吹吸混匀一边分装至 4 个 0.2 mL PCR 管中，每管 50 μL。
3. 将 PCR 管置于 PCR 仪中，设置并运行如下反应程序，PCR 仪热盖 105℃：

热盖温度 105℃		反应体系 50 μL	
步骤	温度	时间	
1	95 °C	3 min	
2 Cycles = 10	98 °C	20 sec	
	64 °C	20 sec	
	72 °C	3 min	
	72 °C	5 min	
5	4 °C	Hold	



4. 产物纯化

注意:

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

- 1) 每反应准备 1 mL 80% 乙醇。
- 2) 将 PCR 扩增产物收集到 1.5 mL 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 200 μ L，则加入 $0.6 \times 200 = 120 \mu\text{L}$ 纯化磁珠。
- 3) 涡旋 15s 混匀后，室温孵育 5min。短暂离心，置于 1.5 mL 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 1.5 mL（或 2 mL）离心管中，暂留。
- 4) 保持 PCR 管始终处于磁力架上，加入 500 μ L 新配制的 80% 乙醇漂洗磁珠。室温孵育 30s，小心移除上清。
- 5) 重复步骤 4，共计漂洗 2 次。
- 6) 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）。
- 7) 取下 PCR 管，加入 20 μ L nuclease-free water，涡旋混匀磁珠，室温孵育 5min。短暂离心后静置于磁力架上，至液体透明澄清。
- 8) 吸取上清并转移至新的 EP 管中，即为第二轮扩增产物，也即 5 端转录组 cDNA。

注意: 此步骤结束后可以将样品于 4℃ 保存 72h，在 -20℃ 可保存 3 个月，或者可直接进行 cDNA 扩增纯化后的 QC 和定量。

5. 扩增纯化产物质检

- 1) 取 1 μ L 上述纯化产物用 Qubit 4 荧光计测定浓度。
- 2) 取约 5ng 上述纯化产物，用 Agilent Fragment Analyzer 5200 进行片段分布分析。
- 3) 合格的产物应同时满足以下几个条件：主峰片段大小应在 900–2000bp 左右；1000bp–5000bp 占比大于 15%；300bp 以下片段占比小于 40%。cDNA 评级分布见下表。（若在满足“合格”类

条件下同时存在基线上调或拖尾严重情况，评级评定为“风险”)

质控等级	评判标准	对应处理
合格	Qubit 检测总量 > 30ng，质检主峰 900bp -2000bp 之间，1000bp-5000bp 占比>15%， 300bp 以下片段占比<10%	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) 若质检发现二轮富集产物 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

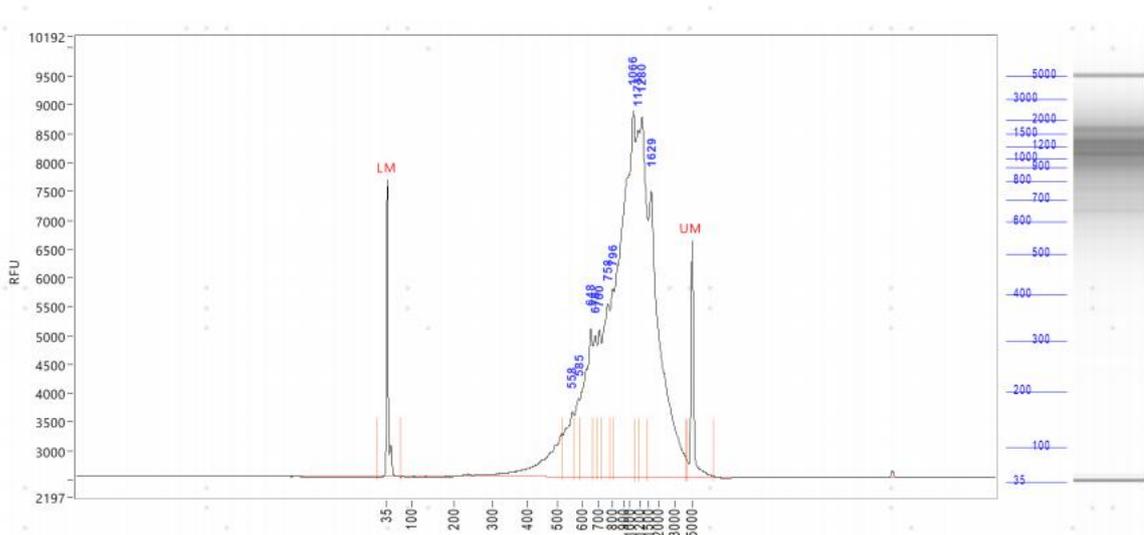


图 5.5 端转录组片段分布示意图

8.5 端转录组文库构建

8.1 片段化



准备材料:

- Fragmentation Buffer V3;
- Fragmentation Enzyme Mix V3 ;
- 1×TE;
- 第二轮扩增产物（Step 7.4 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 35 μ L，并使 PCR 仪热盖保持在 75 $^{\circ}$ C。

热盖温度：75 $^{\circ}$ C		反应体积：35 μ L
步骤	温度	运行时间
1	37 $^{\circ}$ C	10 min
2	65 $^{\circ}$ C	30 min
3	4 $^{\circ}$ C	Hold

2. 室温解冻 Fragmentation Buffer V3，确保完全融化，涡旋混匀（5–8 秒）并短暂离心后冰上备用；如果看到沉淀，涡旋混匀至沉淀消失，溶液变澄清。
3. 使用前将 Fragmentation Enzyme Mix V3 涡旋振荡（5–8 秒）并瞬离，置于冰上备用。
4. 按照以下建议的模板投入量进行建库：
 - 1) 扩增产物总量在 10–50ng 时，选择 10ng 投入量进行建库。
 - 2) 扩增产物总量在 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)
二轮扩增产物 (来自 7.4 产物) (10ng 或 50ng)	Variable
1 \times TE	Variable
Fragmentation Buffer V3	7
Fragmentation Enzyme Mix V3	2
Total	35

- 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。
- 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;
- Ligation Booster;
- Adaptor;
- Step 8.1 的片段化产物。



- 提前按照下表设置接头连接 PCR 程序，反应体系 70 μL ，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：70 μL	
步骤	温度	运行时间	
1	20 $^{\circ}\text{C}$	15 min	
2	4 $^{\circ}\text{C}$	Hold	

- 室温解冻 Adaptor，涡旋混匀后冰上备用。使用前将 Ligation Mix 涡旋混匀，短暂离心后置于冰上备用。
- Ligation Mix 较粘稠，吸取时注意量取准确体积（多反应体系时建议 Adaptor 单独加入）。
- 将上一步反应的 PCR 管置于冰上，配制如下反应体系：

接头连接反应体系*：

组分	体积 (μL)
Fragmented Product (来自 8.1 产物)	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：



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

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

注意：

- AMPure XP 纯化磁珠 (以下简称磁珠) 提前 30min 从 4℃ 中取出，恢复室温备用。
- 磁珠使用前需充分涡旋 15s 振荡混匀。
- 磁珠比较粘稠，应确保精确量取，缓慢加入，否则可能导致分选的片段长度与预期不一致。

- 离心管放置到磁力架上后不应再旋转，因此摆放时需确定离心管开盖方向，离心时，离心管开盖方向朝内放置。

1. 每个反应准备 0.5mL 80%乙醇和 25 μ L 0.1 X TE 溶液（将 1 X TE 与无核酸酶水以 1:10 稀释）。
2. 将产物 PCR 管短暂离心，用移液器测量体积，涡旋混匀磁珠，AMPure XP 纯化磁珠体积为 0.2x 产物总体积。（例如：片段化产物体积为 68.5 μ L，则应使用 $0.2 \times 68.5=13.7 \mu\text{L}$ AMPure XP 纯化磁珠，室温孵育 5min。）
3. 将 PCR 管短暂离心后置于 0.2mL 规格磁力架（磁力架/TND08-C-A/深圳拓能达，本小节磁力架同规格）上，使纯化磁珠与液体分离，待溶液澄清后（约 5min），小心移除上清至一个新的无核酸酶 PCR 管中，暂时留存。
4. 保持 PCR 管置于磁力架上，用 200 μ L 新鲜配制的 80%乙醇漂洗磁珠，室温孵育 30s，小心移除上清。
5. 重复步骤 4，总计漂洗 2 次。
6. 从磁力架上取下 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）。
7. 将 PCR 管从磁力架上取下，加入 17 μ L 0.1 \times TE，涡旋振荡 15s 混匀磁珠，室温孵育 5min。
8. 将 PCR 管短暂离心后置于磁力架上，使磁珠与液体分离，待溶液澄清后（约 5min），小心吸取 15 μ L 上清至新的灭菌 PCR 管中用于步骤 8.4 PCR 富集。

注意：此步骤结束后可以将样品于 4 $^{\circ}$ C 保存 72 小时，-20 $^{\circ}$ C 保存一周。

8.4 PCR 富集

准备材料：

- Library Amp Mix V3;
- TE Adapter Mix;
- Step 8.3 的接头连接后纯化产物。



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。

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
TE Adapter Mix	10
Total	50

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

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

热盖温度: 105° C		反应体积: 50 μL	
步骤	温度	运行时间	
1	98° C	30 sec	
2 (循环数参见下表)	98° C	10 sec	
	65° C	75 sec	
3	65° C	5 min	
4	4° C	Hold	

3. 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:

- Step 8.4 的 PCR 富集产物。



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;
- 无核酸酶 PCR 管;

- 1.5mL 离心管；
- 磁力架/TND08-C-A/深圳拓能达或 DynaMag™-PCR 磁力架/492025/Invitrogen。

注意：

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

1. 每个反应准备 0.5mL 80%乙醇。
2. 将 8.4 产物 PCR 管短暂离心，用移液器测量体积，涡旋混匀磁珠并吸取 25 μ L 加入至 50 μ L 产物中（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。
3. 将 PCR 管短暂离心后置于 0.2mL 规格磁力架（磁力架/TND08-C-A/深圳拓能达，本小节磁力架同规格）上静置，使纯化磁珠与液体分离，待溶液澄清后（约 5min），小心回收上清液至一个新的无菌 PCR 管中，丢弃纯化磁珠。
4. 涡旋振荡混匀磁珠并吸取 7.5 μ L 加入至上清中，涡旋振荡充分混匀，室温孵育 5min。
5. 将 PCR 管短暂离心后置于磁力架上，使纯化磁珠与液体分离，待溶液澄清后（约 5min），小心转移上清液置于新的 PCR 管暂时留存。
6. 保持 PCR 管始终处于磁力架上，加入 200 μ L 新鲜配制的 80% 乙醇漂洗磁珠。室温孵育 30s，小心移除上清。
7. 重复步骤 6，总计漂洗 2 次。
8. 从磁力架上取下 PCR 管，短暂离心，再次置于磁力架上，吸去多余酒精，开盖晾干磁珠 1min（不要超过 2min）。
9. 将 PCR 管从磁力架上取出，加入 20 μ L Buffer EB 洗脱。涡旋振荡 15s 混匀纯化磁珠，室温孵育 5min。
10. 将 PCR 管短暂离心并置于磁力架上，使纯化磁珠与液体分离，待溶液澄清后（约 5min）小心吸取 18 μ L 上清至新的灭菌 1.5mL 离心管中。



注意: 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:

- Step 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;
 - 0.6mL PCR 透明薄壁管 (Qubit 定量, 推荐 Axygen)。
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 测定片段大小分布。
 3. 理想的文库应符合以下标准:
 - a. 在分析区间设定为 300 bp 至 2000 bp 时, 主峰片段范围应在 400 bp 至 700 bp 之间。
 - b. 900 bp 至 1500 bp 之间的片段占比小于 10% 。
 - c. 300 bp 以下的片段占比小于 10% 。
 4. 质控标准及处理方案如下:



质控等级	评判标准	对应处理
合格	Qubit 检测总量>100ng, 主峰 400bp-700bp 之间, 900bp-5000bp 占比<10%	建议直接上机测序
风险	Qubit 检测总量>50ng, 主峰 400b-700bp 之间, 900bp-5000bp 占比 10%-20%	可尝试风险上机测序
不合格	Qubit 值<50ng, 主峰<400bp, 225bp-500bp 占比<30%	不建议上机测序

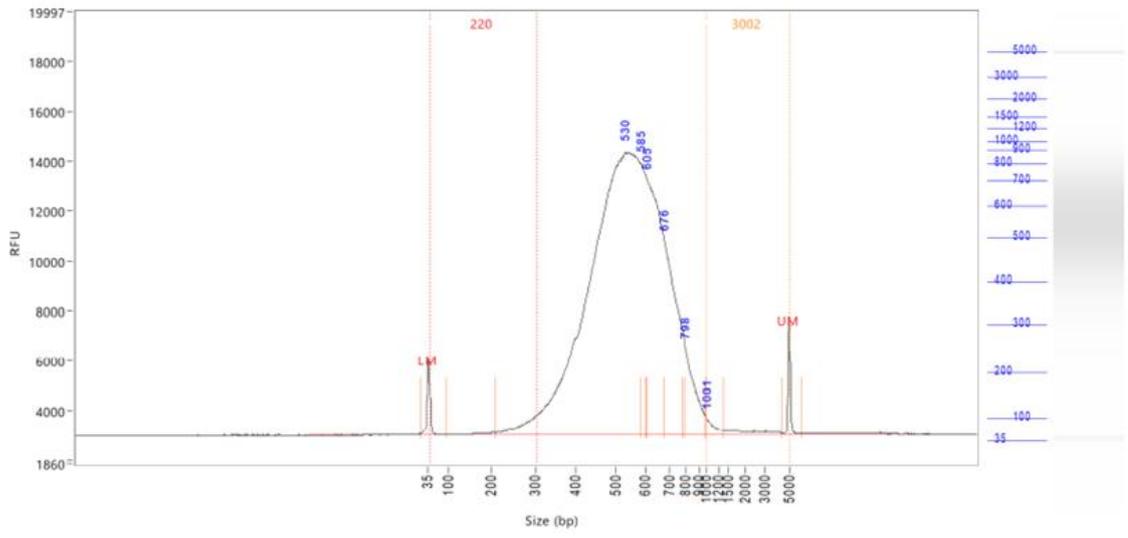


图 6.5 端转录组文库质检图

附录 A 技术原理

利用 NEO-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 FLRNA Barcoding Beads 加入到芯片微孔中，确保每个微孔内只落入 1 个 FLRNA Barcoding Beads。细胞裂解后，带有独特细胞标签（Barcode）及分子标签（UMI）的 FLRNA Barcoding 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 FLRNA Barcoding Beads，将 FL RNA Barcoding Beads 捕获的 mRNA 通过反转录和 PCR 扩增获得 cDNA。获得 cDNA 一部分用于 3 端转录组文库的构建，另一部分的 cDNA 通过环化和富集获得 5 端转录本，构建 5 端转录组文库，通过联合分析两个文库的测序数据获得全长转录组基因表达情况。

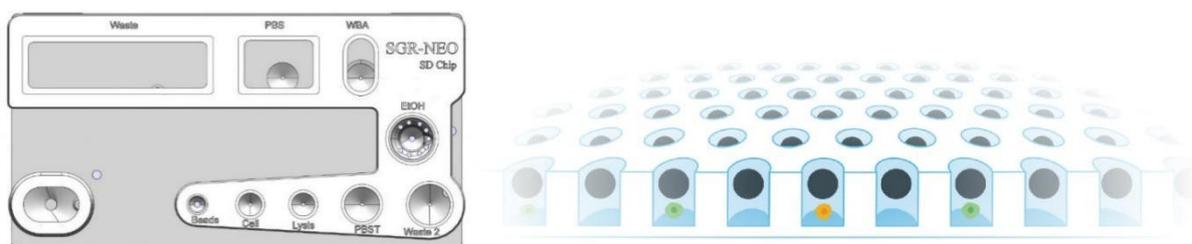


图 7. NEO-chip[®]微流控芯片外形（左）及细微结构（右）

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 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 FLRNA Barcoding Beads 完成单个细胞的 mRNA 的捕获和标记。FLRNA 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。

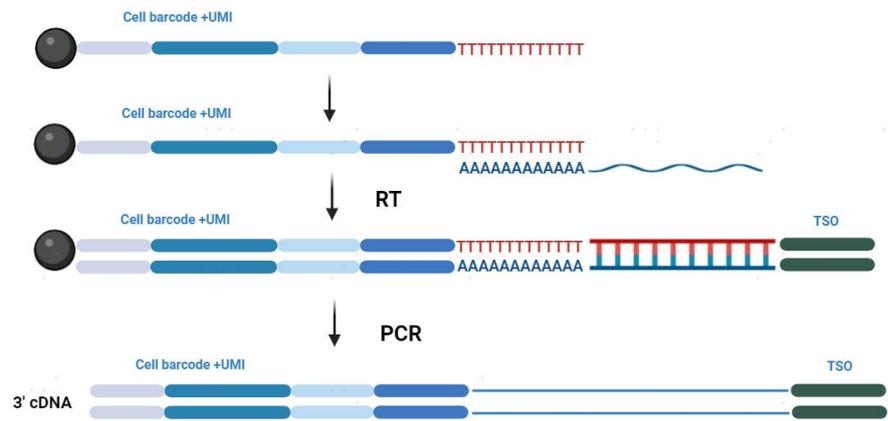


图 8.3 端转录组捕获及反转录原理图

A2.3 端转录组文库构建

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 3 端 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 3 端转录组文库。

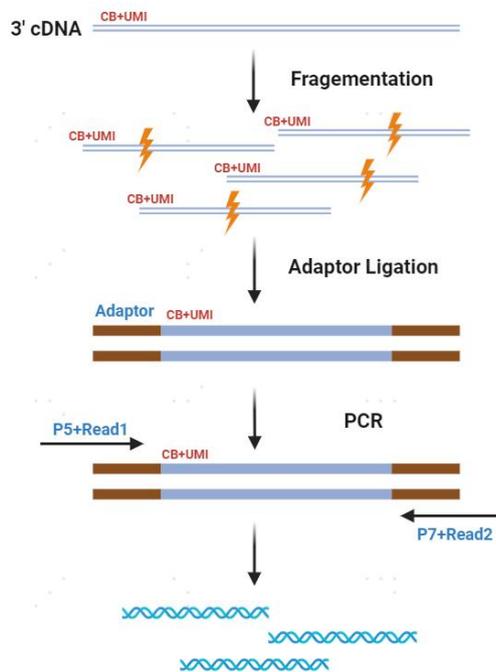


图 9.3 端转录组文库构建原理图

A3 5 端文库构建原理

将获得的 cDNA 通过环化酶切，再通过两轮富集获得 5 端转录组，利用化学方法将 5 端打断成约 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 5 端转录组文库。

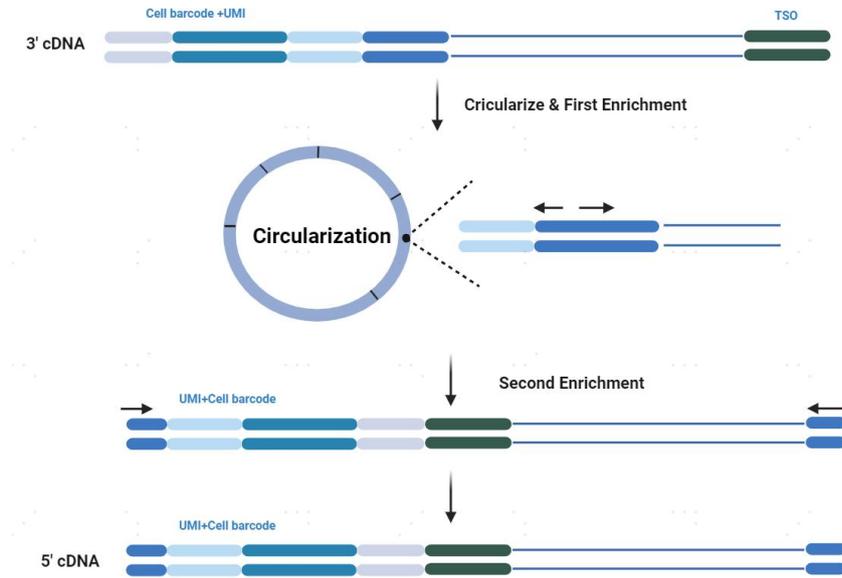


图 10. 5 端转录组富集原理图

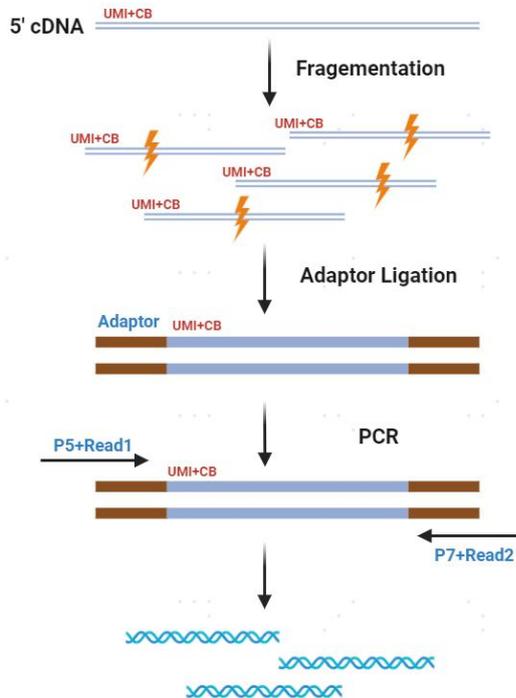
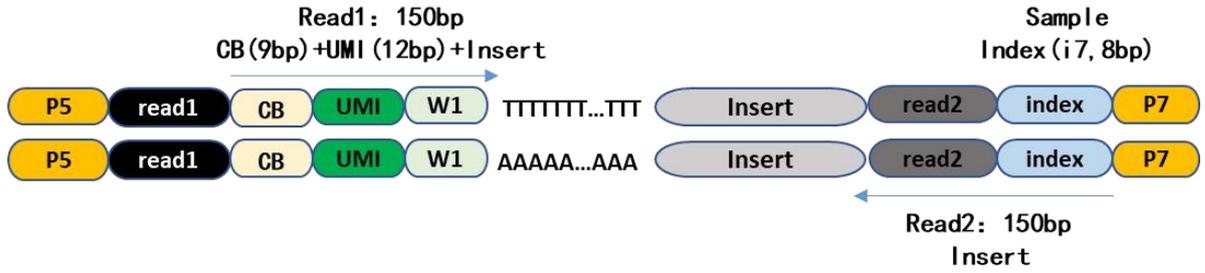


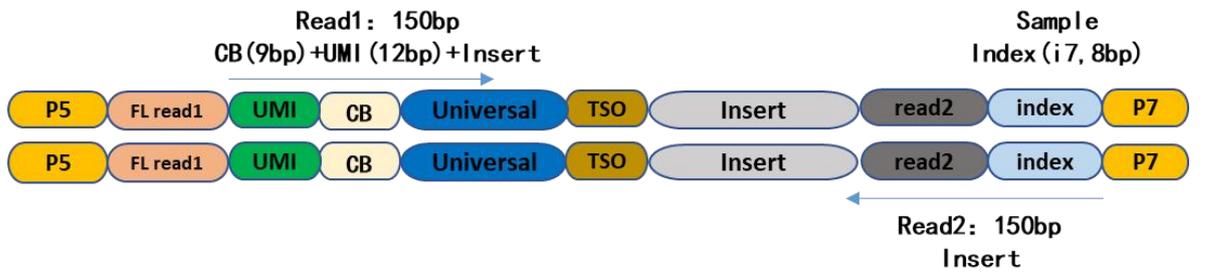
图 11. 5 端转录组富集原理图

A4 3端和5端文库结构

3端文库结构:



5端文库结构:



附录 B cDNA 含量少于 150ng 解决方案 (cDNA 再扩增方案)

若 cDNA 的总量小于 150ng, 则可以通过以下步骤进行 cDNA 再扩增。再扩增的 cDNA 对富集结果没有影响。

准备材料:

- Amplification Master Mix;
- G Primer Mix;
- Amplification Enzyme;
- cDNA (来自 5.4 产物)。

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”, “G Primer Mix”, 涡旋离心然后置于冰上, 按照如下表格在冰上配制再扩增 PCR Mix, 涡旋混匀并短暂离心。

组分	体积 (μL)
Amplification Master Mix	86
G Primer Mix	1.6
Nuclease-free water	Variable
Amplification Enzyme	4
cDNA (来自 5.4 产物, 20 ng/10 ng)	Variable
Total	200

2. 将 200μL 在扩增 PCR Mix, 一边吹打混匀一边分装到 PCR 管中, 每管分装液体体积为 50μL。

3. 盖好 PCR 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。

热盖温度 105℃		反应体系 50μL	
步骤	温度	时间	
1	95° C	3 min	
2 Cycles = 6-8	98° C	20 sec	
	67° C	20 sec	
	72° C	3 min	
4	72° C	5 min	
5	4° C	Hold	

注：若 cDNA 投入量为 20ng，则扩增 6 个循环；若 cDNA 投入量为 10ng，则扩增 8 个循环。

4. 扩增产物纯化

注意：

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

- 1) 每反应准备 1 mL 80%乙醇。
- 2) 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 200 μL，则加入 $0.6 \times 200 = 120\mu\text{L}$ 纯化磁珠。
- 3) 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（或 2mL）离心管中，暂留。
- 4) 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。
- 5) 重复 步骤 4，共计漂洗 2 次。
- 6) 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。



- 7) 取下离心管，加入 20 μ L Buffer EB，涡旋混匀磁珠 15s 左右，室温孵育 5min。短暂离心后静置于磁力架上，至液体透明澄清。
- 8) 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 $^{\circ}$ C 可保存 72h，在 -20 $^{\circ}$ C 可保存 3 个月。

5. 再扩增产物 QC (质检方法同 cDNA QC, 即步骤 5.4)

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）