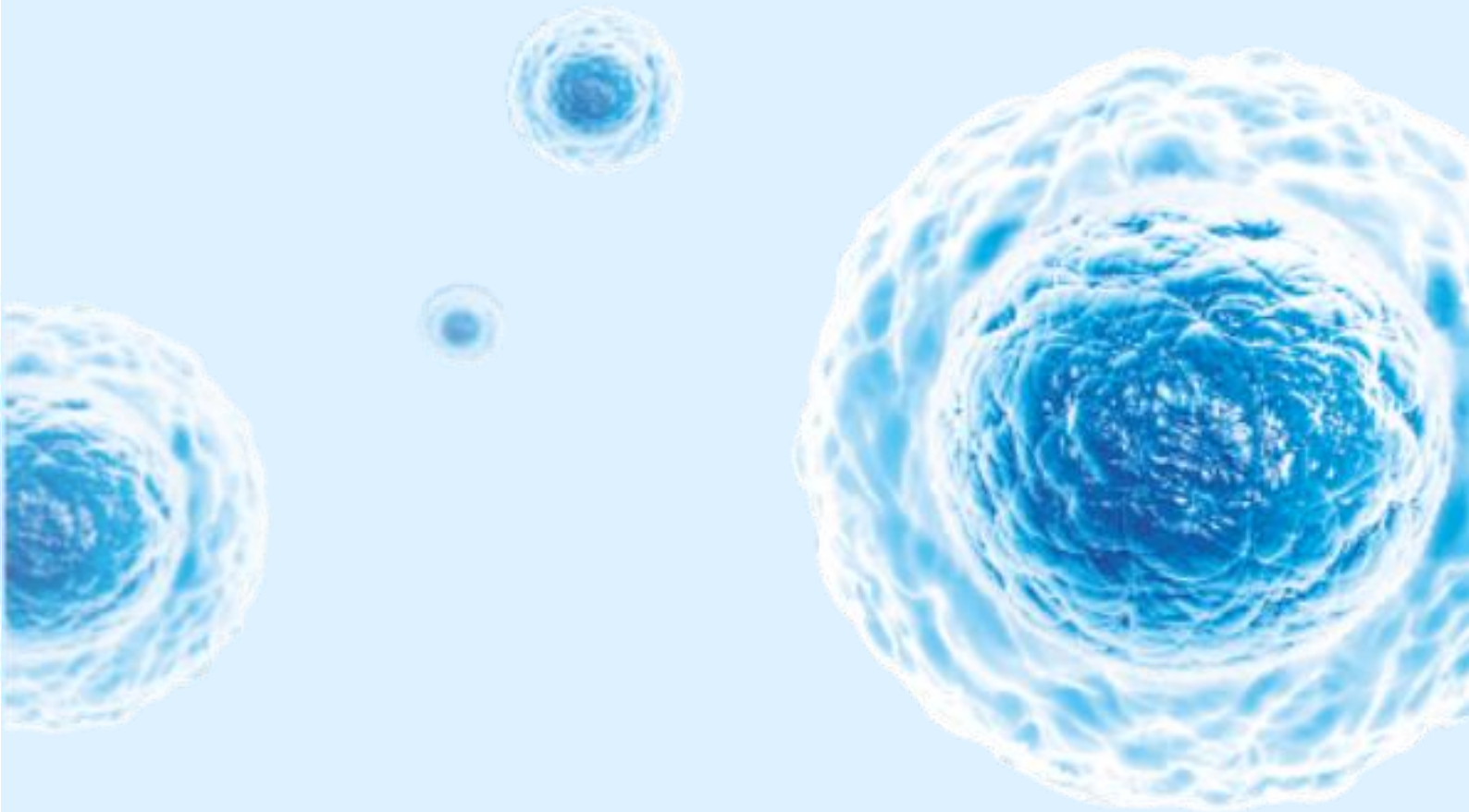
Singleron
新格元生物科技



RetroSCOPE® FFPE Single Nucleus Whole Transcriptome Library Kit for NEO

RetroSCOPE® FFPE 单细胞核全转录组建库试剂盒用户手册 · 自动版（适用于 NEO）

RUO 仅供科学研究使用

2026.08

本手册适用于以下产品

目录号	产品名称	规格
55853251	RetroSCOPE® FFPE Single Nucleus Whole Transcriptome Library Kit for NEO	4 RXNs
55853221	RetroSCOPE® FFPE Single Nucleus Whole Transcriptome Library Kit for NEO	16 RXNs
N/A	RetroSCOPE® FFPE Single Nucleus Whole Transcriptome Library Kit for NEO (HD)	4 RXNs
N/A	RetroSCOPE® FFPE Single Nucleus Whole Transcriptome Library Kit for NEO (HD)	16 RXNs

历史版本信息

版本信息	修改内容
2026/08	初版

版权说明

新格元生物科技有限公司保留所有解释权。本手册中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 组分清单 ..... – 1 –

2. 自备仪器耗材试剂 ..... – 5 –

3. 工作流程和操作时间 ..... – 6 –

4. 实验准备 ..... – 7 –

5. 脱蜡、复水和解交联 ..... – 8 –

5.1 脱蜡 ..... – 8 –

5.2 复水 ..... – 9 –

5.3 解交联 ..... – 10 –

6. 细胞核分离 ..... – 11 –

6.1 细胞核分离 ..... – 11 –

7. 逆转录和接头连接 ..... – 13 –

7.1 逆转录 ..... – 13 –

7.2 接头连接 ..... – 14 –

8. Singleron Matrix NEO 细胞核捕获 ..... – 8 –

8.1 PBS-Tween (PBST) 准备 ..... – 16 –

8.2 Barcode Beads 准备 ..... – 16 –

8.3 裂解混合液制备 ..... – 17 –

8.4 仪器初始化和自检 ..... – 17 –

8.5 细胞核悬液制备 ..... – 20 –

8.6 加载芯片 ..... – 21 –

9. 第二条链合成和 cDNA 扩增 ..... – 25 –

9.1 第二条链合成 ..... – 25 –

9.2 cDNA 扩增 ..... – 27 –

9.3 cDNA 纯化 ..... – 28 –

9.4 cDNA QC ..... – 30 –

10. 文库制备 ..... – 31 –

10.1 文库制备和 index 标记 ..... – 31 –

10.2 文库纯化 ..... – 32 –

10.3 文库 QC ..... – 33 –

附录 A：测序 ..... – 34 –

1.产品信息

1.1 产品概述

RetroSCOPE® FFPE 单细胞核全转录组文库构建试剂盒(适用于 NEO)提供了一套完整的解决方案，用于从 FFPE 或固定组织中捕获核 RNA，并将其转化为可用于 NGS 测序的文库。该方法能够同时分析编码 RNA 和非编码 RNA，不仅限于多聚腺苷酸化 mRNA。

该试剂盒旨在与自动化 Singleron Matrix NEO®仪器配合使用。Singleron Matrix NEO®可同时处理四张 Matrix NEO 芯片。

RetroSCOPE® FFPE 单细胞核全转录组文库构建试剂盒（适用于 NEO）采用 Matrix NEO 芯片，这是一种便携式、含有微孔阵列的微流控芯片。单细胞 RNA 测序工作流程中的多个步骤，如单细胞核分区、细胞核裂解和多聚腺苷酸化分子的捕获，均在 Matrix NEO 芯片内由 Singleron Matrix NEO® 自动完成。Matrix NEO 芯片适用于从多种组织类型中分离细胞核。

1.2 组分清单

RetroSCOPE® FFPE 单细胞核全转录组文库构建试剂盒（适用于 NEO）（4 RXNs）

Box 1: NEO-Chip SD & Barcoding Beads V3 for FFPE

收到后储存在 2℃ 至 8℃。

组分	数量	体积	管盖颜色
Matrix NEO Chip SD	4	–	–
Barcode Beads SD V3	2	1.8 mL	黑色
Wash Buffer A	2	7 mL	白色
Wash Buffer B	2	1.8 mL	白色
0.9x Purification Beads Wash Buffer	2	1.5mL	白色
Plastic Pestle	4	–	–

Box 2: FFPE Single Nucleus RNA Amplification & Library Kit for NEO

收到后储存在 −25℃ 至 −15 ℃。

组分	数量	体积	管盖颜色
1× Antigen Retrieval Solution	3	1.5mL	黄色
RNase Inhibitor	2	50 μL	绿色
FFPE Nuclei Dissociation Buffer	3	1.5mL	红色

FFPE Nuclei Dissociation Enzyme 1	2	25 µL	红色
FFPE Nuclei Dissociation Enzyme 2	1	5 µL	红色
100 mM DTT	1	100 µL	绿色
RT Master Mix	1	400 µL	紫色
FFPE NucRT Primer	2	15 µL	紫色
Reverse Transcriptase	1	25 µL	紫色
10 × Adapter Buffer	1	25 µL	蓝色
FFPE Adapter	2	15 µL	蓝色
FFPE Adapter Conjugator	1	5 µL	蓝色
FFPE Lysis Buffer, Stock	2	300 µL	橙色
FFPE Lysis Enhancer	2	20 µL	橙色
10x Extension buffer	2	25 µL	浅紫色
dNTP mix	1	10 µL	浅紫色
Extension Enzyme	1	10 µL	浅紫色
Amplification Master Mix	2	400 µL	透明
FFPE primer mix	2	75 µL	透明
Amplification Enzyme	2	20 µL	透明
Library Amp Mix V3	2	60 µL	白色
Indexing Primer Mix 1（ATCACGTT）	1	30µL	白色
Indexing Primer Mix2（CGATGTTT）	1	30µL	白色
Indexing Primer Mix 3（TTAGGCAT）	1	30µL	白色
Indexing Primer Mix 4（TGACCACT）	1	30µL	白色

重要提示：

- 请按说明储存各组分。
- 请勿将 Barcoding Beads 储存在 0℃ 以下（请勿冷冻）。

RetroSCOPE® FFPE 单细胞核全转录组文库构建试剂盒（适用于 NEO）（16 RXNs）

Box 1: NEO-Chip SD for FFPE

收到后储存在室温。

组分	数量	体积	管盖颜色
Matrix NEO Chip SD	16	–	–
Plastic Pestle	16	–	–

Box 2: Barcoding Beads V3 & Wash Buffer

收到后储存在 2℃ 至 8℃。

组分	数量	体积	管盖颜色
Barcode Beads SD V3	8	1.8 mL	黑色
Wash Buffer A	7	7 mL	白色瓶
Wash Buffer B	6	1.8 mL	白色
0.9× Purification Beads Wash Buffer	1	8 mL	白色瓶

Box 3: FFPE Antigen Retrieval & Dissociation

收到后储存在 −25℃ 至 −15℃。

组分	数量	体积	管盖颜色
1× Antigen Retrieval Solution	3	6 mL	白色瓶
FFPE Nuclei Dissociation Buffer	3	6 mL	白色瓶

Box 4: FFPE Single Nucleus RNA Amplification SD & Library Reagents for NEO

收到后储存在 −25℃ 至 −15℃。

组分	数量	体积	管盖颜色
FFPE Nuclei Dissociation Enzyme 1	1	180 µL	红色
FFPE Nuclei Dissociation Enzyme 2	1	20 µL	红色
RNase Inhibitor	3	120 µ L	绿色
RT Master Mix	1	1500 µ L	紫色
100 mM DTT	1	400 µL	绿色
FFPE NucRT Primer	1	90 µL	紫色
Reverse Transcriptase	1	130 µL	紫色
10 × Adapter Buffer	1	100 µ L	蓝色
FFPE Adapter	1	90 µL	蓝色
FFPE Adapter Conjugator	1	20 µL	蓝色
FFPE Lysis Buffer, Stock	2	1600 µL	橙色
FFPE Lysis Enhancer	2	90 µL	橙色
10x Extension buffer	1	180 µL	浅紫色
dNTP mix	1	60 µL	浅紫色
Extension Enzyme	1	45 µL	浅紫色
Amplification Master Mix	2	1600 µL	透明
FFPE primer mix	1	550 µL	透明
Amplification Enzyme	1	160 µL	透明
Library Amp Mix V3	1	480 µL	白色
Indexing Primer Mix 1（ATCACGTT）	1	30 µL	白色
Indexing Primer Mix 2（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

重要提示：

- 请按说明储存各组分。
- 请勿将 Barcoding Beads 储存在 0℃ 以下（请勿冷冻）。

2. 自备仪器耗材试剂

两个工作区（pre-PCR 和 post-PCR）均需准备：

- 无水乙醇
- 无核酸酶水
- 1.5 mL 或 2.0 mL 核酸低吸附管
- 15 mL 和 50 mL 锥形离心管
- 血清移液管
- 单通道移液器（p10、p200 和 p1000）
- 无菌、经 RNase/DNase-free 认证的带滤芯吸头
- 小型离心机
- 涡旋振荡器
- Janus 磁力架（新格元 货号 1120020202）或等效产品

用于 FFPE 处理、细胞核分离和 Matrix NEO (Pre-PCR)：

- Singleron MatrixNEO
- RNase Away 或等效产品
- 切片机
- 二甲苯
- 20 μm 细胞滤网
- 旋转混匀仪
- 配备水平转子的冷冻离心机，兼容 15 mL 和 50 mL 锥形离心管
- 倒置显微镜，荧光显微镜
- Thermo Mixer 或等效产品
- PBS pH 7.4（不含 Ca^{2+}、不含 Mg^{2+}）
- 血细胞计数板和 DAPI
- 10% Tween-20

cDNA 扩增和文库制备（Post-PCR）：

- PCR 仪
- Agilent Fragment Analyzer 5200（Agilent 货号 M5310AA）或等效产品
- Qubit 4 荧光计（Thermo Fisher 货号 Q33238）、检测管和 1x dsDNA HS 检测试剂盒（Thermo Fisher 货号 Q32856, Q33230）
- AMPure XP（Beckman Coulter 货号 A63880, A63881, A63882）
- 10 mM Tris-HCl pH 8.5 或洗脱缓冲液（EB，Qiagen 货号 19086）
- 0.2 mL 八联排 PCR 管或 PCR 单管

重要提示：耗材必须无菌且经 RNase/DNase-free 认证。

3.工作流程和操作时间

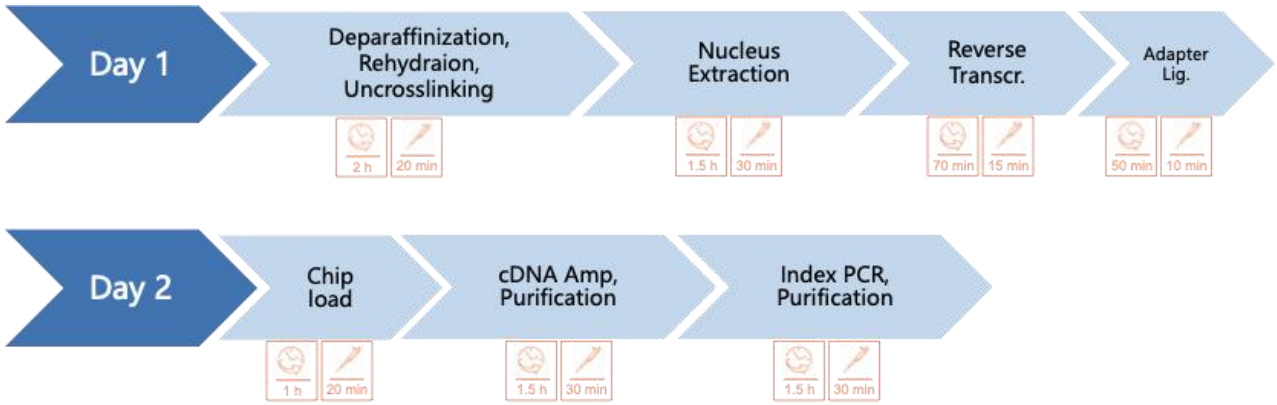


图 1: 工作流程和时间轴概览

4. 准备工作

建议用户为所有需要洁净条件的 pre-PCR 步骤设置“洁净工作区”，包括组织解离、Matrix NEO 芯片加载和逆转录。开展 RNA 相关操作时，应使用 RNase Away（或等效产品）清洁所有工作台面和移液器，并佩戴合适的口罩和实验手套，以避免污染和 RNA 降解。

另设一个工作区（post-PCR），用于进行 cDNA 扩增、纯化和质控，以及文库制备和质控。

重要提示：所有缓冲液使用前均需充分混匀。如缓冲液中出现沉淀或沉积物，请轻柔吹打混匀，并确保使用前溶液澄清。

5. 脱蜡、复水和解交联

5.1 脱蜡



用户自备:

- FFPE 组织块或穿刺活检样本
- 切片机
- 二甲苯（需妥善处理：需交由持有许可的危险废物处理公司处理）

对于 FFPE 蜡块和粗针穿刺活检样本:

1. 使用切片机切除并弃去组织表面最初的 10 μm。
2. 对于 FFPE 蜡块，使用切片机切成蜡卷。请参考下表取材，以获得足量细胞核。

组织表面积	蜡卷厚度	蜡卷数量
>100 mm²	50 μm	3
	25 μm	3
	10 μm	15
	5 μm	30*
50–100 mm²	50 μm	5
	25 μm	5
	10 μm	25*
	5 μm	50*
30–50 mm²	50 μm	10
	25 μm	10
	10 μm	50*
	5 μm	100*

*每个 1.5 mL 管中最多加入 10 个蜡卷。

对于穿刺活检样本，使用镊子和手术刀小心去除核心周围尽可能多的石蜡。将整个核心放入 1.5 mL 管中。

重要提示: 对于经固定但未进行石蜡包埋的组织，请直接进行第 6 节细胞核分离，再按第 5.3 节进行解交联。

3. 在通风橱中，加入 1 mL 二甲苯。用封口膜密封管口以防泄漏。
4. 将管置于旋转混匀仪上，室温旋转孵育 10 分钟，确保充分混匀。
5. 短暂离心，在不扰动组织的情况下弃去二甲苯。
6. 在通风橱中加入 1 mL 二甲苯，使用封口膜密封管口，防止泄漏。
7. 将管重新置于旋转混匀仪上，室温旋转孵育 10 分钟，确保充分混匀。

8. 短暂离心，在不扰动组织的情况下弃去二甲苯。

9. 检查是否仍有石蜡残留。如仍有石蜡，按需重复步骤 6–8。穿刺活检样本可能需要进行 3–4 轮脱蜡。

10. 确认无石蜡残留后，短暂离心并彻底去除二甲苯。

11. 继续进行复水步骤。

5.2 复水

准备材料:

- 脱蜡后的组织（来自上一步）



用户自备:

- 无水乙醇
- 无核酸酶水

1. 为每个样本制备以下乙醇溶液用于复水，并置于冰上：

组分	95% 乙醇(µL)	70% 乙醇(µL)	50% 乙醇(µL)
无水乙醇	950	700	500
无核酸酶水	50	300	500
总计	1 000	1 000	1 000

2. 向完全脱蜡的组织中加入 1 mL 无水乙醇。冰上孵育 5 分钟。

3. 短暂离心，在不扰动组织的情况下弃去无水乙醇。

4. 再重复一次无水乙醇洗涤（步骤 2–3）。

5. 向组织中加入 1 mL 95%乙醇，冰上孵育 5 分钟。

6. 短暂离心，在不扰动组织的情况下弃去 95%乙醇。

7. 向组织中加入 1 mL 70%乙醇，冰上孵育 5 分钟。

8. 短暂离心，在不扰动组织的情况下弃去 70%乙醇。

9. 向组织中加入 1 mL 50%乙醇，冰上孵育 5 分钟。

10. 短暂离心，在不扰动组织的情况下弃去 50%乙醇。

11. 向组织中加入 1 mL 无核酸酶水，冰上孵育 5 分钟。

12. 短暂离心，在不扰动组织的情况下弃去无核酸酶水。

操作提示: 复水后，组织切片容易黏附在管壁和吸头上。操作时应格外小心，避免样本损失。

5.3 解交联



准备材料:

- 复水后的组织（来自上一步）
- 1× Antigen Retrieval Solution（黄色）
- RNase Inhibitor（绿色）

用户自备:

- 10% Tween 20
- 1x PBS

1. 将水浴或干浴预热至 95℃。
2. 向复水的组织样本中加入 1 mL 1× Antigen Retrieval Solution。
3. 95℃孵育 30 分钟。
4. 孵育期间，按下表配制 FFPE Nuclei Wash Buffer，混匀后置于冰上。

FFPE Nuclei Wash Buffer

组分	1 RXN (µL) x 1	2 RXNs (µL) x 2.2	3 RXNs (µL) x 3.3	4 RXNs (µL) x 4.4
PBS	2 979	6 553.8	9 830.7	13 107.6
10% Tween	15	33	49.5	66
RNase Inhibitor	6	13.2	19.8	26.4
总计	3 000	6 600	9 900	13 200

5. 将装有组织的管置于冰上冷却 3 分钟。
6. 短暂离心，在不扰动组织的情况下弃去上清液。
7. 立即进行细胞核分离。或者，将解交联后的组织浸没于 500 µL FFPE Nuclei Wash Buffer 中，在 −80℃下最多保存 3 天。

6. 细胞核提取分离

6.1 细胞核提取分离



准备材料:

- 解交联后的组织（来自上一步）
- FFPE Nuclei Dissociation Buffer (红色)
- FFPE Nuclei Dissociation Enzyme 1 (红色)
- FFPE Nuclei Dissociation Enzyme 2 (红色)
- RNase Inhibitor (绿色)

用户自备:

- 20 µm 细胞滤网
- DAPI
- 10% Tween 20
- 1x PBS
- FFPE Nuclei Wash Buffer （第 5.3 步配制）

1. 在冰上解冻 FFPE Nuclei Dissociation Buffer 和 FFPE Nuclei Dissociation Enzymes。涡旋振荡，短暂离心，置于冰上。确保试剂完全解冻。
2. 在冰上根据下表配制 FFPE 组织细胞核解离液。涡旋振荡，短暂离心，置于冰上保存。

FFPE tissue nuclei dissociation solution:

组分	1 RXN (µL) x1	2 RXNs (µL) x2.2	3 RXNs (µL) x3.3	4 RXNs (µL) x4.4
FFPE Nuclei Dissociation Buffer	985	2 167	3 250.5	4 334
FFPE Nuclei Dissociation Enzyme 1	10	22	33	44
RNase Inhibitor	5	11	16.5	22
总计	1 000	2 200	3 300	4 400

**注:对于肝脏类样本,推荐 FFPE Nuclei Dissociation Enzyme 1 使用量为 40µL,同步减少 FFPE Nuclei Dissociation Buffer 使用量为 955 µL，其他组分不变。*

3. 如组织保存在−80℃，请在冰上解冻，短暂离心，并在不扰动组织的情况下弃去 FFPE Nuclei Wash Buffer。
4. 在冰上向解交联后的组织中加入 100 µL FFPE tissue nuclei dissociation solution。

5. 在冰上，用研磨杵以旋转方式轻柔匀浆 5 分钟，或直至无大块组织残留。为防止液体溅出，处理过程中避免上下捣动。

重要提示：对于经固定但未石蜡包埋的组织，取 20–50 mg 组织置于 1.5 mL 管中。在冰上加入 100 µL FFPE tissue nuclei dissociation solution，并用剪刀剪碎。继续步骤 5。

6. 向匀浆后的组织中加入剩余约 900 µL FFPE tissue nuclei dissociation solution，通过上下吹打充分混匀。

7. 37℃、900 rpm 振荡孵育 30 分钟。每 10 分钟取 10 µL 样品在显微镜下观察；当无明显大块组织碎片时终止消化。

8. 加入 1 µL FFPE Nuclei Dissociation Enzyme 2，室温孵育 5 分钟。

9. 立即以 10,000 × g 离心 3 分钟，在不扰动细胞核沉淀的情况下弃去上清液。

10. 用 1 mL FFPE Nuclei Wash Buffer 重悬沉淀。

11. 将 20 µm 细胞滤网置于 15 mL 锥形离心管上。

12. 将重悬后的细胞核悬液通过 20 µm 细胞滤网过滤，并将滤液收集至已标记的 15 mL 锥形离心管中。

13. 保持滤网置于 15 mL 锥形离心管上，用 2 mL 预冷 PBS 冲洗滤网。滤液总体积应约为 3 mL。

14. 将含细胞核的滤液以 500 × g 离心 5 分钟。

15. 在不扰动细胞核沉淀的情况下弃去上清液。

16. 用 50 µL 预冷 FFPE Nuclei Wash Buffer 上下吹打，轻柔重悬沉淀。

17. 向分离的细胞核中加入 50 µL DAPI 进行染色，上下吹打轻柔混匀。避光并在冰上孵育 5 分钟。

18. 将染色后的细胞核以 500 × g 离心 5 分钟。

19. 用 500 µL 预冷 FFPE Nuclei Wash Buffer 上下吹打，轻柔重悬沉淀，并置于冰上。

20. 使用血细胞计数板和倒置显微镜评估细胞核完整性并计数；在荧光和明场条件下观察细胞核形态。

重要提示：对于经固定但未石蜡包埋的组织，先进行第 5.3 节“解交联”，再进入第 7 节“逆转录与接头连接”。

7. 逆转录和接头连接

7.1 逆转录



准备材料:

- 细胞核悬液（来自上一步）
- RT Master Mix (紫色)
- FFPE NucRT Primer (紫色)
- RNase Inhibitor (绿色)
- Reverse Transcriptase (紫色)

用户自备:

- 预冷无核酸酶水
- FFPE Nuclei Wash Buffer（第 5.3 节配制）

1. 在 PCR 仪上按下表设置逆转录程序，热盖温度设为 50℃。

热盖温度 50℃		反应体积 100 µL
步骤	温度	时间
1	25℃	10 min
2	42℃	30 min
3	4℃	保持

2. 在冰上解冻 RT Master Mix、100 mM DTT 和 FFPE NucRT Primer。涡旋混匀、短暂离心后置于冰上，并确保试剂完全解冻。

重要提示: 若 RT Master Mix 中出现沉淀，涡旋混匀直至溶液澄清.

3. 按下表在冰上配制 RT Mix。按表中从上到下的顺序加入试剂，涡旋混匀、短暂离心后置于冰上。

组分	1 RXN (µL) x1	2 RXNs (µL) x 2.2	3 RXNs (µL) x 3.3	4 RXNs (µL) x 4.4
RT Master Mix	60	132	198	264
预冷的无核酸酶水	27.5	60.5	90.75	121
FFPE NucRT Primer	5	11	16.5	22
RNase Inhibitor	2.5	5.5	8.3	11
Reverse Transcriptase	5	11	16.5	22
总计	100	220	330	440

4. 从第 6 节获得的细胞核中取 2×10^5 – 5×10^5 个，加入新标记的 1.5 mL 管。
5. 4℃、850 × g 离心 5 分钟。
6. 小心去除上清液，加入 100 µL RT Mix，上下吹打轻柔混匀以重悬细胞核。

7. 将悬液转移至 0.2 mL 管中，置于 PCR 仪并启动逆转录程序。
8. PCR 仪降至 4℃ 后，以 850 × g 离心 5 分钟。
9. 小心去除上清液，避免扰动细胞核沉淀。
10. 用 200 µL 预冷 FFPE Nuclei Wash Buffer 轻柔重悬细胞核，以 850 × g 离心 5 分钟，小心去除上清液并避免扰动细胞核沉淀；该步骤共重复两次。
11. 可在 −80℃下最多保存 48 小时，或立即进行下一步。

7.2 接头连接



准备材料:

- 细胞核悬液（来自上一步）
- 10x Adapter Buffer (蓝色)
- FFPE Adapter (蓝色)
- FFPE Adapter Conjugator (蓝色)
- RNase Inhibitor (绿色)

用户自备:

- 预冷无核酸酶水
- FFPE Nuclei Wash Buffer（第 5.3 节配制）

1. 在 PCR 仪上按下表设置连接程序，热盖温度设为 50℃。

热盖温度 50℃		反应体积 50 µL
步骤	温度	时间
1	37℃	30 min
2	4℃	保持

2. 室温解冻 10x Adapter Buffer 和 FFPE Adapter。涡旋振荡，短暂离心后置于冰上，并确保试剂完全解冻。
3. 按下表在冰上配制 Ligation Mix。按表中从上到下的顺序加入试剂，涡旋混匀、短暂离心后置于冰上。

Ligation Mix

组分	1 RXN (µL) x1	2 RXNs (µL) x2.2	3 RXNs (µL) x3.3	4 RXNs (µL) x4.4
10x Adapter Buffer	5	11	16.5	22
FFPE Adapter	5	11	16.5	22
无核酸酶水	37	81.4	122.1	162.8
FFPE Adapter Conjugator	1	2.2	3.3	4.4

RNase Inhibitor	2	4.4	6.6	8.8
总计	50	110	165	220

4. 将上述获得的细胞核在 4℃、850 × g 条件下离心 5 分钟。
5. 小心去除上清液，避免扰动细胞核沉淀，并置于冰上。
6. 用 50 µL Ligation Mix 上下吹打，轻柔重悬细胞核。
7. 置于 PCR 仪中并启动连接程序。
8. PCR 仪降至 4℃后，在 4℃、850 × g 条件下离心 5 分钟。
9. 小心去除上清液，避免扰动细胞核沉淀。
10. 用 200 µL 预冷 FFPE Nuclei Wash Buffer 轻柔重悬细胞核。
11. 4℃、850 × g 离心 5 分钟。
12. 小心去除上清液，避免扰动细胞核沉淀，并置于冰上。
13. 用 120 µL 预冷 FFPE Nuclei Wash Buffer 轻柔重悬细胞核。
14. 将来自第 7.1 节末的细胞核在 850 x g, 4℃下离心 5 分钟。
15. 小心去除上清液，不要扰动细胞核沉淀。置于冰上。
16. 用 50 µL 连接混合液轻轻移液上下吹打重悬细胞核。
17. 置于 PCR 仪中，启动连接程序。
18. 当 PCR 仪达到 4℃时，在 850 x g, 4℃下离心 5 分钟。
19. 小心去除上清液，不要扰动细胞核沉淀。
20. 用 200 µL 预冷 FFPE Nuclei Wash Buffer 轻轻重悬细胞核。
21. 在 850 x g, 4℃ 下离心 5 分钟。
22. 小心去除上清液，不要扰动细胞核沉淀。置于冰上。
23. 用 120 µL 预冷 FFPE Nuclei Wash Buffer 轻轻重悬细胞核。
24. 继续进行 Matrix NEO 加载，或将细胞核于−80℃保存最多 48 小时。

8. Singleron Matrix NEO 细胞核捕获

8.1 PBS-Tween (PBST) 准备



用户自备:

- PBS
- 10% Tween-20

1. 按下表配制 PBST（含 0.1% v/v Tween-20 的 PBS）。涡旋振荡，短暂离心。置于一旁备用，直至加载 Matrix NEO 芯片。

PBST:

组分	体积(μL)
PBS	1980
10% Tween-20	20
总计	2000

8.2 Barcode Beads 准备



准备材料:

- Barcode Beads SD V3 or HD V3 (黑色)

用户自备:

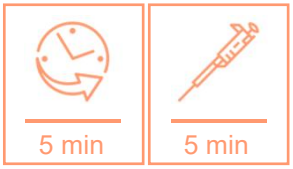
- Janus 磁力架（新格元货号 1120020202）或等效产品。
- PBS

1. 充分涡旋振荡 Barcode Beads V3 30 秒，直至完全重悬。
2. 每个反应吸取 900 μL Barcode Beads V3，加入新标记的 1.5 mL 管中。
3. 短暂离心，将管置于磁力架上直至液体澄清。
4. 弃去上清液，避免扰动磁珠。
5. 将管从磁力架上取下，用 1 mL PBS 重悬磁珠。
6. 短暂离心后，将管放回磁力架，直至液体澄清。
7. 弃去上清液，避免扰动磁珠。
8. 再用 1 mL PBS 洗涤两次。
9. 最后一次洗涤后，用 80 μL PBS 重悬磁珠（SD),100 μL PBS 重悬磁珠(HD)。

10. 将 Barcode Beads V3 置于室温保存，直至加载 Matrix NEO 芯片。

重要提示：如 1 小时内不使用，请将磁珠储存在 4℃。

8.3 裂解液配置



准备材料：

- FFPE Lysis Buffer, Stock (橙色)
- FFPE Lysis Enhancer (橙色)

1. 室温解冻 FFPE Lysis Buffer, Stock 和 FFPE Lysis Enhancer。涡旋混匀、短暂离心后置于冰上，并确保试剂完全解冻。
2. 按下表在冰上配制 FFPE Lysis Mix。涡旋混匀、短暂离心后置于冰上。

FFPE Lysis Mix:

组分	1 RXN (µL) x 1	2 RXNs (µL) x 2.2	3 RXNs (µL) x 3.3	4 RXNs (µL) x 4.4
FFPE Lysis Buffer, Stock	142.5	313.5	470	627
FFPE Lysis Enhancer	7.5	16.5	25	33
总计	150	330	495	660

8.4 仪器初始化和自检

准备材料:

- Singleron Matrix NEO
- Matrix NEO 芯片
- NEOproxy （仅适用于版本 A，版本 B 不需要）

1. 若 Matrix NEO 芯片储存于 4℃，将其恢复至室温。
2. 插上电源线，使用仪器背面的电源开关开启仪器。
3. 电源指示灯变为绿色，显示屏上出现用户界面。仪器将执行自检程序。请勿中断“Self-Checking...”程序。



版本 A　　版本 B

图 2：仪器自检过程

4. 自检程序完成后，屏幕上将显示“准备”（图 3）.

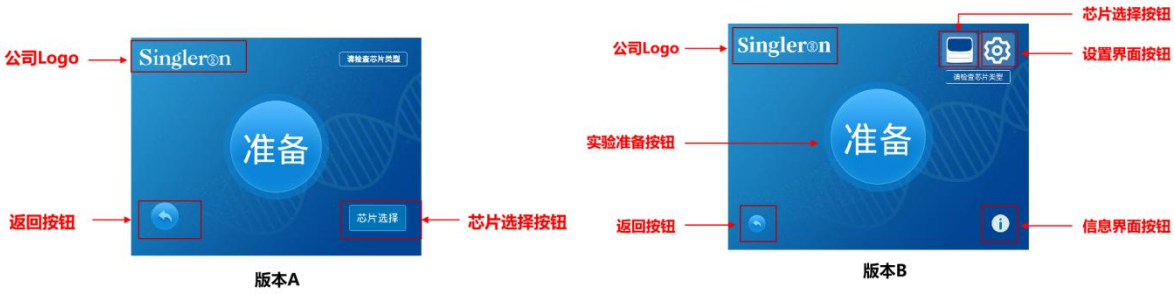


图 3：仪器准备界面

5. 通过选择右下角的“芯片选择”（版本 A）或右上角的“仪器图标”（版本 B）来编辑程序。

6. 修改 Matrix NEO 芯片程序以匹配所使用的 Matrix NEO 芯片：“SD”对应标准 Matrix NEO 芯片，“HD”对应高密度 Matrix NEO 芯片。



图 4：Matrix NEO 芯片程序选择界面，显示通道 1 至 4（CH1–CH4）。

版本 A：需要 NEOproxy 芯片；版本 B：不需要 NEOproxy 芯片。

7. 如果某些 Matrix NEO 芯片通道未使用，可选择任意程序。对于版本 A，未占用的通道需要插入 NEOproxy 芯片作为配平使用（见步骤 12 和 14）。

8. 选择“保存”，然后点击“返回”返回主界面。

9. 选择“准备”打开载仓。载台将滑出，露出四个 Matrix NEO 芯片通道。

10. 识别仪器载台版本:

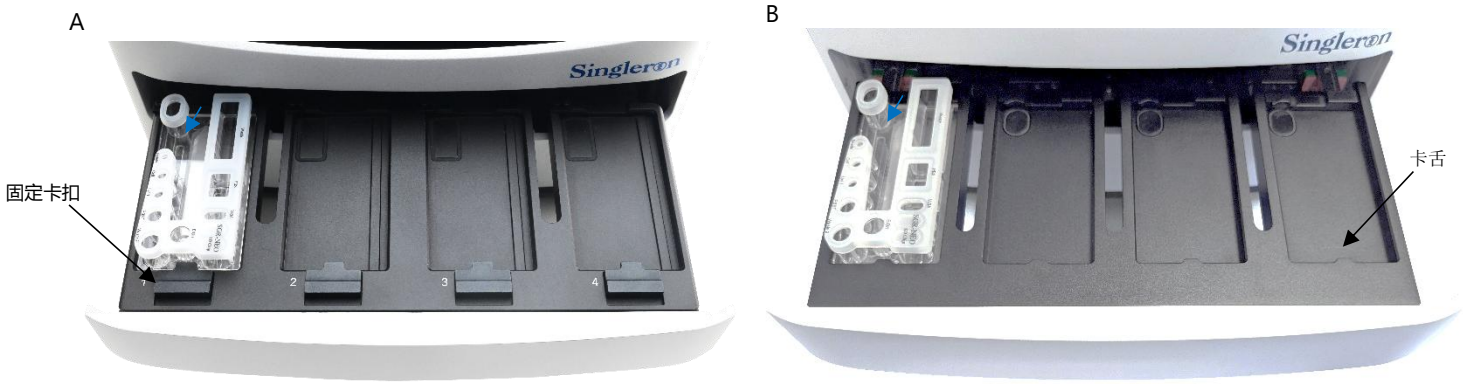


图 5：版本 A–带固定卡扣的 NEO 载台。版本 B–带卡舌的 NEO 载台

对于带卡扣的型号:

11. 按照以下步骤将第一张 Matrix NEO 芯片插入四个 Matrix NEO 芯片通道之一：轻轻向自己方向拉动卡扣，将 Matrix NEO 芯片放入通道中，并按图 5A 所示方向对齐。松开卡扣以固定 Matrix NEO 芯片

重要提示: 确保 Matrix NEO 芯片在加载通道中的方向正确至关重要。条形码磁珠收集储液槽应位于每个通道的后左角（蓝色箭头指示）。

12. 对每张额外的 Matrix NEO 芯片重复步骤 11。如果使用的芯片少于四张，将 NEOproxy 芯片（仅限仪器型号 1）插入剩余的空通道中。如果使用型号 2 仪器，未使用的通道可留空。

对于带卡舌的型号:

13. 按照以下步骤将第一张 Matrix NEO 芯片插入四个 Matrix NEO 芯片通道之一：轻轻将芯片推向通道后部的弹簧加载模块。芯片就位后，松开，让其滑入通道前部的卡舌下方（图 5B）。

重要提示: 确保 Matrix NEO 芯片在加载通道中的方向正确至关重要。条形码磁珠收集储液槽应位于每个通道的后左角（蓝色箭头指示）.

14. 对每张额外的 Matrix NEO 芯片重复步骤 13。如果使用的芯片少于四张，将 NEOproxy 芯片（仅限仪器型号 1）插入剩余的空通道中。如果使用型号 2 仪器，未使用的通道可留空。

重要提示:

- 确保所选的 Matrix NEO 芯片程序和位置与对应通道（1 至 4）中使用的 Matrix NEO 芯片型号匹配。
- Matrix NEO 芯片通道必须摆放 Matrix NEO 芯片或 NEOproxy 芯片进行配平，以确保运行期间形成良好的气密密封（仅限仪器版本 A）。
- 运行期间避免振动或其他干扰 Matrix NEO 仪器的情况。涡旋振荡器或离心机的振动可能影响仪器的气密性。
- 含有 NEOproxy 芯片（仅限仪器版本 A）或留空（仅限仪器版本 B）的 Matrix NEO 芯片通道可设置为 SD 或 HD 程序，不影响运行。

8.5 细胞核悬液制备



准备材料:

- RNase Inhibitor (绿色)
- 来自第 7.2 节的细胞核悬液

用户自备:

- 预冷 PBS（4℃）
- 10% Tween 20

1. 在冰上根据下表配制细胞核稀释缓冲液。涡旋振荡，短暂离心，置于冰上保存。

Nuclei Dilution Buffer:

组分	1 RXN (µL) x 1	2 RXNs (µL) x 2.2	3 RXNs (µL) x 3.3	4 RXNs (µL) x 4.4
预冷 PBS	993	2 184.6	3 276.9	4 369.2
10% Tween 20	5	11	16.5	22
RNase Inhibitor	2	4.4	6.6	8.8
总计	1 000	2 200	3 300	4 400

2. 使用预冷细胞核稀释缓冲液，按下表稀释细胞核悬液。

重要提示: 请注意，只有加载到芯片上的一部分细胞核会被捕获到微孔中。为了在 Matrix NEO 芯片

上捕获 10,000 个细胞核（左列），需要加载 100 µL 浓度为 4.0×10⁵个细胞核/mL 的悬液（右列）（即 40,000 个细胞核）。

3. 立即进行细胞加载到 Matrix NEO 芯片的步骤.

目标细胞核捕获数	推荐细胞核浓度
8 000 – 10 000	（3.5 – 4.0）×10^5 nuclei /mL
10 000 – 15 000	（4.0 – 4.5）×10^5 nuclei /mL
15 000 – 20 000	（4.5 – 5.0）×10^5 nuclei /mL

8.6 加载芯片



准备材料:

- PBST (来自第 4.1 节)
- 洗涤后的 Barcode Beads（来自第 4.2 节）
- 裂解混合液（来自第 4.3 节）
- 稀释的细胞悬液（来自第 5.2 节）
- 预冷 Wash Buffer A（4℃）（瓶装）

用户自备:

- 无水乙醇
- 预冷 PBS（4℃）

1. 使用 P200 移液器，按下表将无水乙醇缓慢加入标记为 EtOH 的储液槽中（如图 6 所示）。加液时，确保移液器吸头位于带有端口的边缘下方。无水乙醇应仅接触储液槽底部的独特端口。

组分	体积（µL）		储液槽
	SD	HD	
无水乙醇	105 µL	150 µL	EtOH

重要提示:
无水乙醇将在 Matrix NEO 芯片内部流动，并在到达芯片左侧 V 形通道前约 1 厘米处停止（图 6）.

2. 根据下表中的体积，将 PBST、预冷 PBS、Wash Buffer A 和 FFPE 裂解混合液加入各自对应的储液槽中（图 6）。

组分	体积（μL）		储液槽
	SD	HD	
PBST	300 μL	350 μL	PBST
预冷 PBS	1400 μL	1800 μL	PBS
预冷 Wash Buffer A	500 μL	500 μL	WBA
预冷 FFPE Lysis Mix	150 μL	170 μL	Lysis

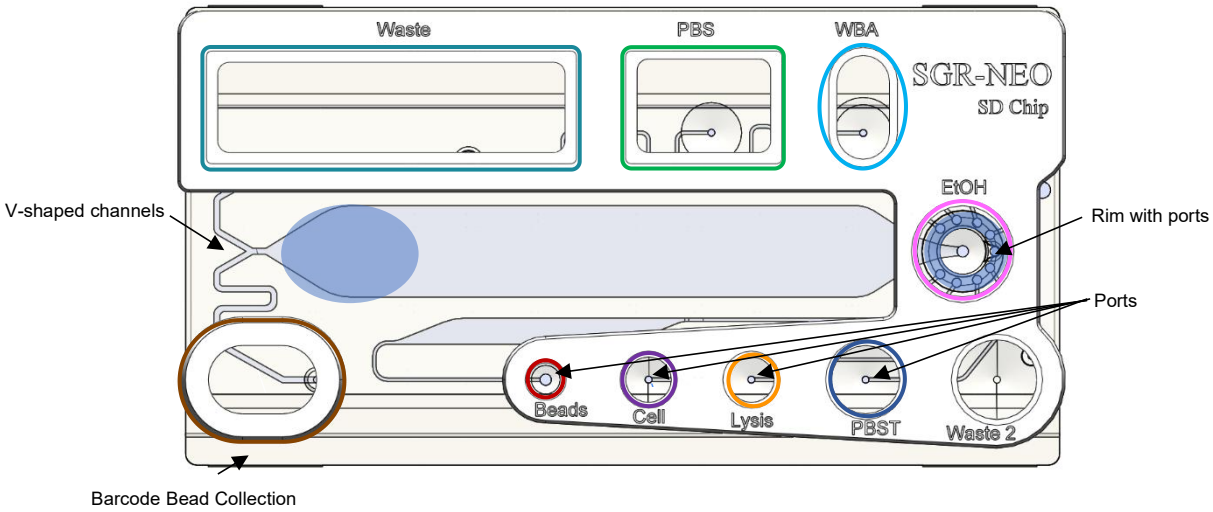


图 6: Matrix NEO 芯片示意图

重要提示:

- 确保将试剂直接加入 Matrix NEO 芯片的储液槽中。清除溅到硅胶垫上的任何溶液。
- 添加试剂时，避免移液器吸头接触储液槽底部（端口）。
- 添加试剂后，储液槽底部不应有气泡。

3. 重悬 Barcode Beads 并立即按图 6 所示移入对应的储液槽。

组分	体积（μL）		储液槽
	SD	HD	
Barcode Beads V3	80 μL	100 μL	Beads

4. 小心地通过移液上下吹打重悬细胞。按下表将重悬的细胞悬液加入图 6 所示的“Cell”储液槽中。

组分	体积(μL)		储液槽
	SD	HD	
Diluted nuclei suspension	100 μL	140 μL	Cell

5. 加入细胞悬液后，立即点击“开始”按钮以运行程序，载台将自动缩回仪器内部。总运行时间 39 分钟 30 秒。屏幕上将显示倒计时（图 7）。

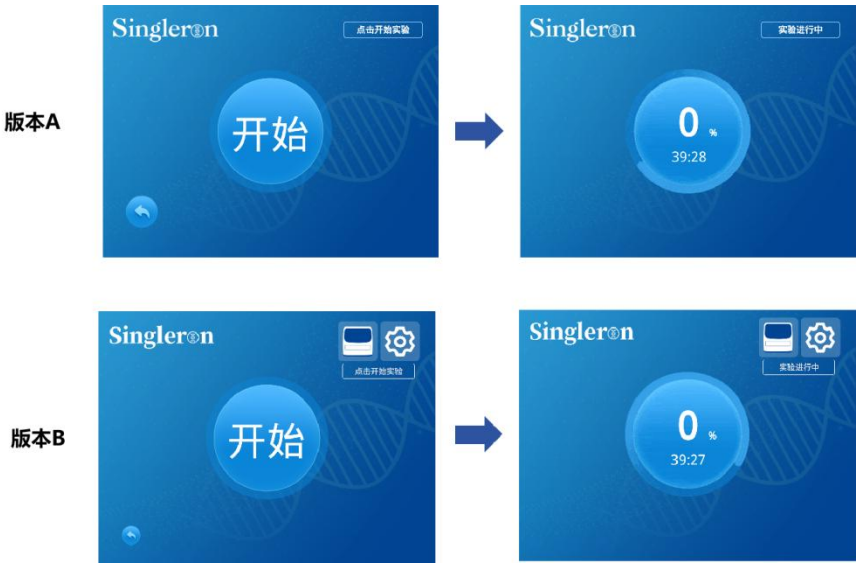


图 7：Matrix NEO 芯片加载后并开始运行的仪器界面。

6. 运行结束后，点击“确认”，芯片载台自动推出。



图 8：显示“实验已结束”对话框与“已完成”的仪器界面。

7. 从“Barcode Bead Collection”储液槽（图 6 中 Matrix NEO 芯片左下角）收集 Barcode Beads。此时磁珠结团是正常现象。
8. 将 Barcode Beads 转移至预冷的标记好的 2.0 mL 管中，置于冰上。
9. 为了回收剩余的 Barcode Beads，用 200 µL 预冷的 Wash Buffer A 冲洗“Barcode Bead Collection”储液槽两次。将所有回收的磁珠转移至与上一步相同的 2.0 mL 管中，置于冰上。

重要提示：请勿收集或重复使用位于废液储液槽（“Waste”和“Waste 2”）中的磁珠

10. 废弃使用过的 Matrix NEO 芯片。但保留 NEOproxy 芯片供后续使用。
11. 取出所有 Matrix NEO 芯片和 NEOproxy 芯片后，点击“已完成”将载台返回关闭位置。仪器可进行另一次运行或关闭。
12. 实验结束或不再继续实验时，请操作仪器背面电源开关关闭仪器。

13. 立即继续进行“第二链合成与 cDNA 扩增”部分。

重要提示:

- 请勿丢弃 NEOproxy 芯片（仅限版本 A）。
- 如果当天不再进行其他运行，请关闭 Singleron Matrix NEO®。
- 每次运行结束后，从载台上取出所有 Matrix NEO 芯片。使用 70%乙醇和无绒擦拭布清洁 Matrix NEO 芯片载台。

9. 第二链合成与 cDNA 扩增

9.1 第二链合成



准备材料:

- 预冷 Wash Buffer A（4℃）（瓶装）
- 预冷 Wash Buffer B（4℃）（白色）
- 10x Extension Buffer (浅紫色)
- dNTP Mix (浅紫色)
- Extension Enzyme (浅紫色)
- Barcode Beads（来自上一步）

用户自备:

- 无核酸酶水
- Janus 磁力架（新格元 货号 1120020202）或等效产品

1. 在 ThermoMixer 上，根据下表设置第二条链合成程序。

		反应体积 100 µL
温度	时间	转速
25℃	10 min	900 rpm
37℃	30 min	900 rpm
75℃	10 min	可选*
4℃	保持	–

* 如无法立即进行 cDNA 扩增反应，请在 75℃孵育 10 分钟。

2. 室温解冻 10x Extension Buffer 和 dNTP Mix。涡旋 10 秒、短暂离心后置于冰上，并确保试剂完全解冻。
3. 按下表在冰上配制 Second-Strand Synthesis Mix。按表中从上到下的顺序加入试剂，涡旋混匀、短暂离心后置于冰上。。

Second-Strand Synthesis Mix:

组分	1 RXN (µL) x1	2 RXNs (µL) x 2.2	3 RXNs (µL) x 3.3	4 RXNs (µL) x 4.4
10x Extension Buffer	10	22	33	44
预冷的无核酸酶水	85	187	280.5	374
dNTP Mix	2.5	5.5	8.25	11
Extension Enzyme	2.5	5.5	8.25	11
总计	100	220	330	440

4. 短暂离心装有从 Matrix NEO 芯片收集的磁珠的离心管。
5. 将离心管置于磁力架上，孵育直至上清液澄清。
6. 小心弃去上清液，避免扰动磁珠。
7. 将管从磁力架上取下，加入 1 mL 预冷 Wash Buffer A，上下吹打充分混匀。
8. 短暂离心后将管放回磁力架，静置至上清液澄清。
9. 小心弃去上清液，避免扰动磁珠，然后将管从磁力架上取下。
10. 加入 500 µL 预冷 Wash Buffer B，上下吹打充分混匀。
11. 短暂离心后将管放回磁力架，静置至上清液澄清。
12. 小心弃去上清液，避免扰动磁珠。
13. 短暂离心后将管放回磁力架，使用细吸头去除所有残余缓冲液。
14. 将管从磁力架上取下，加入 100 µL Second-Strand Synthesis Mix。
15. 轻柔上下吹打，使磁珠均匀分散。
16. .将管置于预热的金属浴中并启动第二链合成程序。
17. 继续进行 cDNA 扩增。

9.2 cDNA 扩增

准备材料

- Amplification Master Mix (透明)
- FFPE Primer Mix (透明)
- Amplification Enzyme (透明)
- 第二条链合成产物（来自上一步）



用户自备:

- 无核酸酶水
- Janus 磁力架（新格元 货号 1120020202）或等效产品

1. 在 PCR 仪上按下表设置 cDNA 扩增程序，热盖温度设为 105 ℃。

热盖温度 105℃		反应体积 50 µL
步骤	温度	时间
1	95℃	3 min
2 循环数 = 4	98℃	20 sec
	65℃	45 sec
	72℃	90 sec
3 循环数 = 8	98℃	20 sec
	67℃	20 sec
	72℃	90 sec
4	72℃	5 min
5	4℃	保持

2. 室温解冻 Amplification Master Mix 和 FFPE Primer Mix。涡旋混匀、短暂离心后置于冰上，并确保试剂完全解冻。

3. 按下表在冰上配制 PCR Mix。按表中从上到下的顺序加入试剂，涡旋混匀、短暂离心后置于冰上。

PCR Mix

组分	1 RXN (µL) x1	2 RXNs (µL) x 2.2	3 RXNs (µL) x 3.3	4 RXNs (µL) x 4.4
Amplification Master Mix	172	378.4	567.6	756.8
FFPE Primer Mix	32	70.4	105.6	140.8
预冷的无核酸酶水	188	413.6	620.4	827.2
Amplification Enzyme	8	17.6	26.4	35.2
总计	400	880	1 320	1 760

4. 将第二链合成产物短暂离心并置于磁力架上。
5. 静置至上清液澄清，然后小心弃去上清液，避免扰动磁珠。
6. 短暂离心后将离心管放回磁力架，使用细吸头去除所有残余液体。
7. 将离心管从磁力架上取下，加入 400 µL PCR Mix，上下吹打充分混匀。
8. 将混合物均匀分配到标记好的 8 联排 PCR 管中，每管加入 50 µLPCR 混合液（含磁珠）。盖紧 8 联排管的管盖。

重要提示: 以下步骤应在 post-PCR 工作区进行。

9. 将 8 联管置于预热的 PCR 仪中，启动 cDNA 扩增程序。
10. 当 PCR 仪达到 4℃时，cDNA 可在 4℃保存 48 小时，或在-20℃保存最多一周。

9.3 cDNA 纯化

准备材料:



- 扩增后的 cDNA（来自上一步）
- 0.9× Purification Beads Wash Buffer（白色）

用户自备:

- 无水乙醇
- 无核酸酶水
- 洗脱缓冲液（10 mM Tris-HCl pH 8.5）
- AMPure XP
- Janus 磁力架（新格元 货号 1120020202）或等效产品

重要提示:

- 使用前彻底涡旋振荡 AMPure XP 磁珠
- 将 AMPure XP 磁珠恢复至室温：取约 1 mL 等分试样，放置 30 分钟或直至达到室温。
- 缓慢移取 AMPure XP 磁珠以确保体积准确。

1. 每个反应制备 2 mL80%乙醇。现配现用以获得最佳结果。
2. 将八联 PCR 管中扩增后的 cDNA 合并至已标记的 1.5 mL 管中。
3. 短暂离心，并使用移液器测量体积。
4. 按扩增 cDNA 总体积的 0.9× 计算 AMPure XP beads 体积（例如，测得产物体积为 400 µL，则使用 0.9 × 400 µL = 360 µL AMPure XP beads）。
5. 涡旋混匀 AMPure beads，取计算所得体积加入扩增 cDNA 管中。
6. 涡旋 30 秒充分混匀，室温孵育 5 分钟。

7. 短暂离心，将管置于磁力架上 5 分钟或直至液体澄清。



图 9：使用 Janus 磁力架进行 AMPure XP 磁珠纯化

8. 小心弃去上清液，避免扰动磁珠。

9. 将管从磁力架上取下，加入 400 µL 0.9× Purification Beads Wash Buffer。

10. 涡旋 30 秒充分混匀，室温孵育 5 分钟。

11. 短暂离心，将管置于磁力架上 5 分钟或直至液体澄清。

12. 小心弃去上清液，避免扰动磁珠。

13. 保持管位于磁力架上，加入 800 µL 80%乙醇 洗涤磁珠。

14. 室温孵育 30 秒，小心弃去上清液，避免扰动磁珠。

15. 再重复一次 80%乙醇洗涤。

16. 短暂离心后，将管放回磁力架。

17. 使用细吸头去除所有残余乙醇。

18. 保持管盖打开，使磁珠干燥约 2 分钟或直至不再发亮（不超过 5 分钟）。

19. 将管从磁力架上取下，加入 20 µL 洗脱缓冲液，涡旋混匀。

20. 室温孵育 5 分钟，短暂离心后放回磁力架，直至液体澄清。

21. 将含纯化 cDNA 的上清液转移至新标记的 1.5 mL 管中。

22. cDNA 可在 4℃保存 72 小时，或在 −20℃保存最长 3 个月。

9.4 cDNA 质控

准备材料:

- 纯化后的 cDNA（来自上一步）



用户自备:

- Qubit 4 荧光计或等效产品
- Qubit 检测管和 Qubit 1x dsDNA HS 检测试剂盒
- Agilent Fragment Analyzer 5200（Agilent 货号 M5310AA）或等效产品
- Agilent Fragment Analyzer DNA/NGS 试剂盒（Agilent 货号 DNF-474-0500）或等效产品

1. 取 cDNA 等分试样（1 µL），使用 Qubit 4 荧光计测量浓度。
2. 取 cDNA 等分试样（2-5 ng/µL），使用 Agilent Fragment Analyzer 5200 测量片段大小分布.
3. 理想的 cDNA 应满足以下标准:

   a) cDNA 总量应 >30ng。

   b) 主峰应在 170 – 350 bp 之间;

   c) 150 – 450 bp 之间的片段应占总分子的 50%以上;

   d) 150 bp 以下的片段应占总分子的 30%以下。

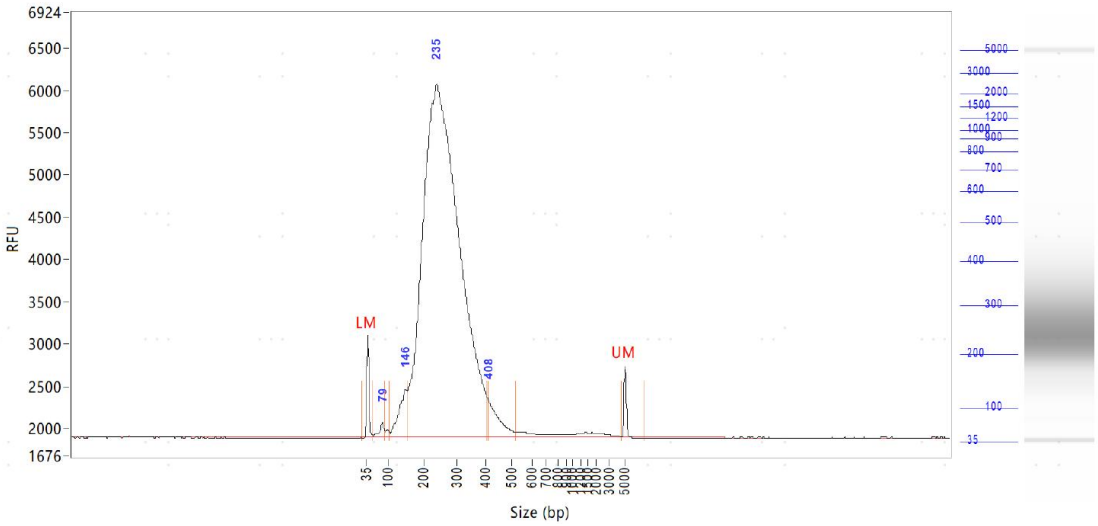


图 10：Agilent Fragment Analyzer 5200 上的 cDNA 质控图谱

10. 文库制备

10.1 文库制备和 index 标记

准备材料:

- Library Amp Mix v2 (白色)
- Unique Dual Index (白色)
- 纯化后的扩增 cDNA（来自上一步）



用户自备:

- 无核酸酶水

1. 在 PCR 仪上，根据下表设置文库 index 标记程序。热盖温度应设为 105℃。

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 = 6	98℃	10 sec
	65℃	75 sec
3	65℃	5 min
4	4℃	保持

2. 在冰上解冻 Library Amp Mix v2 和 Unique Dual Indexes。涡旋混匀、短暂离心后置于冰上，并确保试剂完全解冻。

3. 在冰上按下表顺序加入以下试剂：

组分	体积（µL）
Purified cDNA (20 ng)	可变
Library Amp Mix v2	25
Unique Dual Indexes*	10
无核酸酶水	可变
Total	50

** 为每个样本选择不同的 UDI Adapter。*

4. 移液上下吹打混匀，短暂离心。
5. 将反应管置于预热的 PCR 仪中，运行*文库 index 标记程序。
6. 当 PCR 仪达到 4℃时，立即进行扩增文库的纯化和大小筛选。

10.2 文库纯化



准备材料:

- 扩增并标记 index 的文库（来自上一步）

用户自备:

- 无水乙醇
- 无核酸酶水
- 洗脱缓冲液（10 mM Tris-HCl pH 8.5）
- AMPure XP
- Janus 磁力架（新格元货号 1120020202）或等效产品

重要提示:

- 使用前彻底涡旋振荡 AMPure XP 磁珠。
- 将 AMPure XP 磁珠恢复至室温：取约 1 mL 等分试样，放置 30 分钟或直至达到室温。
- 缓慢移取 AMPure XP 磁珠以确保体积准确。

1. 每个反应制备 0.5 mL 80%乙醇。现配现用以获得最佳结果。
2. 短暂离心，用移液器测量体积。
3. 计算相当于扩增文库总体积 0.9 倍的 AMPure XP 磁珠体积。（例如，若测量产物体积为 50 µL，则使用 0.9 × 50 µL = 45 µLAMPure XP 磁珠。
4. 涡旋振荡 AMPure 磁珠至均一。将计算体积的磁珠加入扩增文库管中。
5. 涡旋振荡 30 秒充分混匀，室温孵育 5 分钟。
6. 短暂离心管子，置于磁力架上 5 分钟或直至液体澄清。
7. 小心弃去上清液，不要扰动磁珠。
8. 从磁力架上取下管子，加入 100 µL 0.9× Purification Beads Wash Buffer。
9. 涡旋振荡 30 秒充分混匀，室温孵育 5 分钟。
10. 短暂离心管子，置于磁力架上 5 分钟或直至液体澄清。
11. 小心弃去上清液，不要扰动磁珠。
12. 将管子保留在磁力架上，加入 200 µL 80%乙醇洗涤磁珠。
13. 室温孵育 30 秒。小心弃去上清液，不要扰动磁珠。
14. 重复 80%乙醇洗涤一次。
15. 短暂离心，将管子放回磁力架。

16. 使用细吸头吸除所有残留乙醇。
17. 保持管盖打开，干燥磁珠约 2 分钟或直至不再有光泽（不超过 5 分钟）。
18. 从磁力架上取下管子，加入 20 µL 洗脱缓冲液涡旋振荡混匀。
19. 室温孵育 5 分钟。短暂离心，放回磁力架直至液体澄清。
20. 将含有纯化文库的上清液转移至新的标记好的 1.5 mL 管中。
21. 文库可在 4℃保存 72 小时，或在−20℃保存最多三个月。

10.3 文库质控

准备材料:

- 纯化的文库（来自上一步）



用户自备:

- Qubit 4 荧光计、Qubit 检测管和 Qubit 1x dsDNA HS 检测试剂盒
- Agilent Fragment Analyzer 5200（Agilent 货号 M5310AA）或等效产品
- Agilent Fragment Analyzer DNA/NGS 试剂盒（Agilent 货号 DNF−474−0500）或等效产品

1. 取 1 µL 文库，使用 Qubit 4 荧光计 测定浓度。
2. 取文库（2 - 5 ng/µL），使用 Agilent Fragment Analyzer 5200 检测片段大小分布。
3. 理想的 cDNA 应满足以下标准：
   a) 文库产量 >100 ng。
   b) 主峰应在 220 – 350 bp 之间。
   c) 大于 500 bp 的片段应占总分子的 10%以下。
   d) 小于 200 bp 的片段应占总分子的 10%以下。

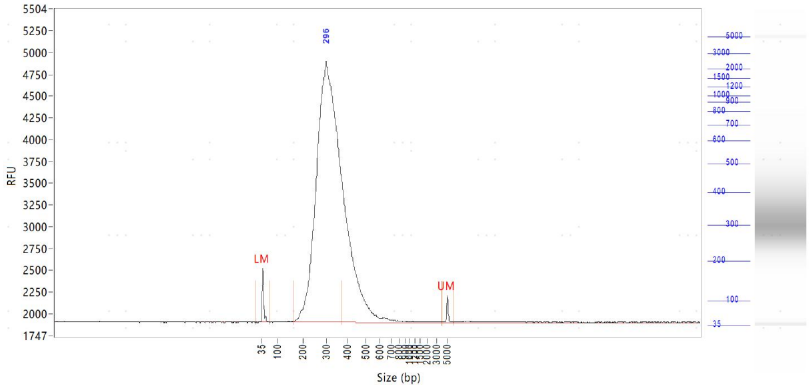


图 11：Agilent Fragment Analyzer 5200 上的文库质控图谱

附录 A：测序

测序文库

该试剂盒产生标准的 Illumina 双端测序构建体，以 P5 开始，以 P7 结束。P5 和 P7 是标准 Illumina 测序序列，用于桥式扩增。文库还包含 8 碱基的 i5 和 i7 样本 index 序列（见下表：样本 sheet 的 index 序列）。在“Read 1”测序引物结合位点附近有细胞条形码（27 碱基的独特序列和连接子）和 12 碱基的 UMI。Read 2 用于解读不同的转录 RNA 序列（mRNA、lncRNA、miRNA 等）。通过对这些文库测序，可生成标准的 Illumina FASTQ 文件。

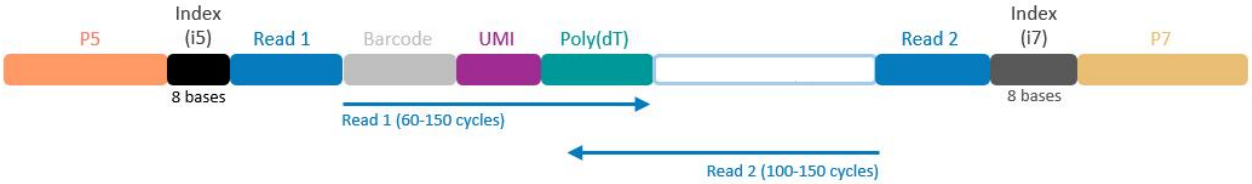


图 12：测序文库结构示意图.

Illumina 测序仪兼容性

新格元生物科技有限公司已验证了以下测序仪的兼容性。测序仪的选择可能影响实验性能。有关性能差异的更多信息，请访问新格元技术支持网站。

- NovaSeq 6000
- NovaSeq X/ X Plus

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）