



DNBelab C 系列高通量单细胞 RNA 文库制备试剂盒套装 V3.0 (TaiM 4)

使用说明书

版本: 2.0

仅供科研使用

青岛华大智造科技有限责任公司

关于说明书

本说明书适用于 DNBelab C 系列高通量单细胞 RNA 文库制备试剂盒套装 V3.0 (TaiM 4)。说明书版本 2.0。

本说明书及其包含的信息为青岛华大智造科技有限责任公司（以下简称华大智造）的专有保密信息，未经华大智造的书面许可，任何个人或组织不得全部或部分地对本说明书进行重印、复制、修改、传播或公布给他人。本说明书的读者为终端用户。说明书作为产品的一部分，由华大智造授权终端用户予以使用。严禁未授权的个人使用本说明书。

华大智造对本说明书不做任何种类的保证，包括（但不限于）用于特定目的的商业性和合理性的隐含保证。华大智造已经采取措施，确保本说明书的准确性。但是，华大智造对遗漏不承担责任，并保留任何对本说明书和产品进行改进以提高其可靠性、功能或设计的权利。

本说明书中的所有图片均为示意图，图片内容可能与实物有细微差异，请以购买的产品为准。

Qubit™ 是赛默飞世尔科技公司或其子公司的商标。DNBSEQ™ 是华大智造或其子公司在中国和/或其他国家（地区）的商标或注册商标。文中涉及的其它名称及商标属于各自所有者资产。

©2024 青岛华大智造科技有限责任公司 版权所有。

版本记录

	日期	版本	修订内容摘要
修订	2024 年 12 月 25 日	2.0	<ul style="list-style-type: none">• 增加细胞核样本要求• 修改样本相悬浮液配制体系• 增加样本相、磁珠相悬浮液配制以及载片加样的相关提示事项• 增加破乳回收水相示意图• 删除 DNBSEQ-T7RS 高通量测序试剂套装 V2.0 相关描述
编制	2024 年 5 月 30 日	1.0	首次发布



提示

- 请下载最新版说明书，对照相应版本的试剂盒使用。
- 搜索货号或产品名，下载说明书：www.mgi-tech.com/download/files

目录

第 1 章 产品信息	1
1.1 产品描述	1
1.2 适用范围	1
1.3 适配测序平台	1
1.4 试剂盒组分	1
1.5 试剂盒储存条件及有效期	4
1.6 自备物料清单	5
1.7 文库制备操作全流程概览	7
1.8 注意事项	9

第 2 章 样本要求及处理	9
2.1 注意事项	9
2.2 实验前准备	10
2.2.1 样本要求	10
2.2.2 实验室要求	11
2.2.3 准备试剂	11
2.3 制备细胞(核)悬浮液	12

第 3 章 液滴生成	12
3.1 实验前准备	13
3.1.1 准备试剂与设备	13
3.1.2 准备样本相悬浮液	13
3.1.3 准备磁珠相悬浮液	14
3.2 进行液滴生成	15

第 4 章 液滴内 RT 反应	19
4.1 实验前准备	19
4.2 进行液滴回收及 RT 反应	20

第 5 章 破乳及 RT 产物分选	21
5.1 实验前准备	21

5.2 进行破乳回收及磁珠分选	21
5.2.1 方案一	22
5.2.2 方案二	24
第 6 章 cDNA 中间产物扩增及纯化	25
6.1 实验前准备	26
6.2 进行 cDNA 扩增	26
6.3 cDNA 产物纯化	27
第 7 章 Oligo 产物文库构建操作流程	28
7.1 实验前准备	29
7.2 Oligo 产物文库构建	29
7.3 Oligo 文库片段筛选	30
第 8 章 cDNA 文库构建操作流程	32
8.1 实验前准备	32
8.2 片段化及末端修复	33
8.3 接头连接	33
8.4 接头连接产物纯化及片段筛选	34
8.5 PCR 扩增	35
8.6 PCR 扩增产物筛选	36
8.7 环化文库构建 (cDNA 文库和 Oligo 文库)	37
第 9 章 测序	38
9.1 文库结构	38
9.2 MGISEQ-2000RS 测序平台实验要求	39
9.2.1 实验前准备	39
9.2.2 DNB 制备	39
9.2.3 文库 Pooling	39
9.2.4 测序参数	40
9.3 DNBSEQ-T7RS 测序平台实验要求	41
9.3.1 实验前准备	41
9.3.2 DNB 制备	41
9.3.3 文库 Pooling	41

9.3.4 测序参数	42
附录 1 关于 DNA Clean Beads 及纯化	43
附录 2 关于 Barcode Primer 使用	44
附录 3 制造商信息	46

--- 此页有意留白 ---

第 1 章 产品信息

本章介绍产品基本信息，包括产品描述、适用范围、适配测序平台、试剂盒组分、试剂盒储存条件及有效期、自备物料清单以及注意事项。

1.1 产品描述

DNBelab C 系列单细胞组学研究整体解决方案，基于独特的 DNBelab C 系列单细胞文库制备技术和强大的 DNBSEQ 测序技术，配合自主研发的单细胞分析软件，可实现一站式的单细胞组学研究。

基于液滴微流控技术，DNBelab C 系列高通量单细胞 RNA 文库制备试剂盒套装 V3.0 (TaiM 4) 使用 MGI 自主设计的 DNBelab C-TaiM 4 液滴生成仪，通过 mRNA 捕获磁珠和液滴识别微珠以及单细胞 RNA 文库制备试剂盒，将单细胞(核)悬液快速制备成适用于华大智造 DNBSEQ 系列测序平台的专用文库。本产品采用了液滴内反转录的策略，以及 mRNA 捕获磁珠和液滴识别微珠，可以提高捕获 mRNA 的数量，使得构建的单细胞 RNA 文库具有较低的污染率及出众的基因检测能力。本试剂盒提供的所有试剂、载片和耗材都经过严格的质量控制和功能验证，保证了单细胞 RNA 文库制备的稳定性和可重复性。

1.2 适用范围

本试剂盒适用于真核生物的高通量单细胞 3'RNA 文库制备，使用前需将样本制备成单细胞(核)悬液。

 **警告** 本试剂盒仅供科研使用，不能用于临床诊断。

1.3 适配测序平台

适配测序平台	MGISEQ-2000RS
	DNBSEQ-T7RS
cDNA 文库测序类型	47 (1 链) +100 (2 链) +10
Oligo 文库测序类型	32 (1 链) +42 (2 链) +10

1.4 试剂盒组分

本试剂盒套装规格分为 16 反应和 4 反应，均包含 5 个模块，详细信息见下表。

表 1 DNBelab C 系列高通量单细胞 RNA 文库制备试剂盒套装 V3.0 (TaiM 4)
(货号: 940-001818-00, 16RXN)

试剂盒种类	组分信息	管盖颜色	规格及数量
DNBelab C 系列高通量单细胞 RNA 文库制备试剂盒套装 V3.0 (盒 1 液滴生成) (货号: 940-001820-00)	Cell Beads-V3	本色	560 μ L/管 \times 2 管
	Index Carrier	本色	280 μ L/管 \times 2 管
	Lysis Buffer-V3	本色	72 μ L/管 \times 2 管
	Breakage Reagent	棕色	800 μ L/管 \times 2 管
	P100 Oil	本色	7.6 mL/瓶 \times 2 瓶
	Cover Oil	本色	3.2 mL/瓶 \times 2 瓶
	DNA Clean Beads	本色	8.352 mL/瓶 \times 2 瓶
DNBelab C 系列高通量单细胞 RNA 文库制备试剂盒套装 V3.0 (盒 2 液滴生成) (货号: 940-001819-00)	Beads Buffer	本色	728 μ L/管 \times 2 管
	Cell Solution-V3	本色	142 μ L/管 \times 2 管
	RT Primer-V3	本色	33 μ L/管 \times 2 管
	DIR Regent-V3	本色	13 μ L/管 \times 2 管
	RT Enzyme-V3	本色	64 μ L/管 \times 2 管
	RNase Inhibitor	本色	132 μ L/管 \times 2 管
	cDNA Amp Enzyme	本色	400 μ L/管 \times 2 管
	cDNA Amp Primer-V3	本色	33 μ L/管 \times 2 管
DNBelab C 系列高通量单细胞 RNA 文库制备试剂盒 V3.0 (盒 3 文库制备) (货号: 940-001821-00)	Frag Enzyme-V3	本色	80 μ L/管 \times 2 管
	Frag Buffer-V3	本色	40 μ L/管 \times 2 管
	DNA Ligase-V3	本色	80 μ L/管 \times 2 管
	Ligation Buffer-V3	本色	160 μ L/管 \times 2 管
	scRNA Adapter-V3	本色	40 μ L/管 \times 2 管
	PCR Amp Enzyme	本色	600 μ L/管 \times 2 管
DNBelab C 系列载片(TaiM 4) (货号: 940-001822-00)	载片	/	16 个/盒 \times 1 盒
	密封垫	/	5 件/袋 \times 1 袋
DNBelab C 系列单细胞文库制备样本标签试剂盒 S (货号: 940-001920-00)	Barcode Primer-1~8	本色	八联排 \times 2 组
	Barcode Primer-9~16	本色	八联排 \times 2 组
	Barcode Primer-17~24	本色	八联排 \times 2 组
	Barcode Primer-25~32	本色	八联排 \times 2 组

表 2 DNBelab C 系列高通量单细胞 RNA 文库制备试剂盒套装 V3.0 (TaiM 4)
(货号: 940-001924-00, 4RXN)

试剂盒种类	组分信息	管盖颜色	规格及数量
DNBelab C 系列高通量单细胞 RNA 文库制备试剂盒套装 V3.0 (盒 1 液滴生成) (货号: 940-001927-00)	Cell Beads-V3	本色	280 μL/管×1 管
	Index Carrier	本色	140 μL/管×1 管
	Lysis Buffer-V3	本色	36 μL/管×1 管
	Breakage Reagent	棕色	400 μL/管×1 管
	P100 Oil	本色	3.8 mL/瓶×1 瓶
	Cover Oil	本色	1.6 mL/瓶×1 瓶
	DNA Clean Beads	本色	4.176 mL/瓶×1 瓶
DNBelab C 系列高通量单细胞 RNA 文库制备试剂盒套装 V3.0 (盒 2 液滴生成) (货号: 940-001929-00)	Beads Buffer	本色	364 μL/管×1 管
	Cell Solution-V3	本色	71 μL/管×1 管
	RT Primer-V3	本色	17 μL/管×1 管
	DIR Regent-V3	本色	7 μL/管×1 管
	RT Enzyme-V3	本色	32 μL/管×1 管
	RNase Inhibitor	本色	66 μL/管×1 管
	cDNA Amp Enzyme	本色	200 μL/管×1 管
	cDNA Amp Primer-V3	本色	17 μL/管×1 管
DNBelab C 系列高通量单细胞 RNA 文库制备试剂盒 V3.0 (盒 3 文库制备) (货号: 940-001925-00)	Frag Enzyme-V3	本色	40 μL/管×1 管
	Frag Buffer-V3	本色	20 μL/管×1 管
	DNA Ligase-V3	本色	40 μL/管×1 管
	Ligation Buffer-V3	本色	80 μL/管×1 管
	scRNA Adapter-V3	本色	20 μL/管×1 管
	PCR Amp Enzyme	本色	300 μL/管×1 管
DNBelab C 系列载片(TaiM 4) (货号: 940-001928-00)	载片	/	4 个/盒×1 盒
	密封垫	/	2 件/袋×1 袋
DNBelab C 系列单细胞文库制备样本标签试剂盒 S (货号: 940-001926-00)	Barcode Primer-1~8	本色	八联排×1 组
	Barcode Primer-9~16	本色	八联排×1 组

1.5 试剂盒储存条件及有效期

表 3 试剂盒存储及运输条件

试剂盒种类	储存温度	运输温度	有效期
DNBelab C 系列高通量单细胞 RNA 文库制备试剂盒 V3.0 (盒 1 液滴生成) (货号: 940-001820-00, 16RXN) (货号: 940-001927-00, 4RXN)	2 °C ~ 8 °C	2 °C ~ 8 °C	见试剂盒标签
DNBelab C 系列高通量单细胞 RNA 文库制备试剂盒 V3.0 (盒 2 液滴生成) (货号: 940-001819-00, 16RXN) (货号: 940-001929-00, 4RXN)	-25 °C ~ -15 °C	-80 °C ~ -15 °C	
DNBelab C 系列高通量单细胞 RNA 文库制备试剂盒 V3.0 (盒 3 文库制备) (货号: 940-001821-00, 16RXN) (货号: 940-001925-00, 4RXN)	-25 °C ~ -15 °C	-80 °C ~ -15 °C	
DNBelab C 系列载片 (TaiM 4) (货号: 940-001822-00, 16RXN) (货号: 940-001928-00, 4RXN)	10 °C ~ 30 °C	0 °C ~ 30 °C	
DNBelab C 系列 单细胞文库制备样本标签试剂盒 S (货号: 940-001920-00, 16RXN) (货号: 940-001926-00, 4RXN))	-25 °C ~ -15 °C	-80 °C ~ -15 °C	



- 提示
- 使用干冰运输时, 收到产品检查是否还有剩余干冰。
 - 当运输条件、储存条件及使用方式都正确时, 所有组分在有效期内均能保持完整活性。

1.6 自备物料清单

表 4 自备物料清单

类型	名称	推荐品牌	货号
仪器	DNBelab C-TaiM 4 单细胞液滴生成仪	MGI	900-000637-00
	超净工作台	/	/
	显微镜（针对细胞核，计数需使用荧光显微镜）	/	/
	电子天平	/	/
	漩涡混匀仪	/	/
	微型离心机	/	/
	手动单道移液器： <ul style="list-style-type: none"> • 0.1 μL ~ 2.5 μL • 0.5 μL ~ 10 μL • 2 μL ~ 20 μL • 10 μL ~ 100 μL • 20 μL ~ 200 μL • 100 μL ~ 1000 μL 	/	/
	手动 8 道移液器： <ul style="list-style-type: none"> • 1 μL ~ 10 μL • 2 μL ~ 10 μL • 5 μL ~ 50 μL • 20 μL ~ 200 μL 	/	/
	深孔 PCR 仪（100 μL 体系，带热盖）	/	/
	离心机或同等功能仪器	Eppendorf	5810R
	1.5 mL 管磁力架	Thermo Fisher	12321D
	0.2 mL 管磁力架	New England Biolabs	S1515S
	Qubit 3.0 荧光定量仪或同等功能仪器	Thermo Fisher	Q33216
	核酸片段分析仪器	/	/

类型	名称	推荐品牌	货号
试剂	DNA-OFF SOLUTION	TAKARA	9036
	RNase Zap	AMBION	AM9782
	75%医用酒精	/	/
	PBS, pH 7.4	Gibco	10010031
	BSA (牛血清蛋白)	生工	A600332-0005
	0.4%台盼蓝溶液或同等功能的分析试剂	Gibco	15250061
	DAPI (用于细胞核染色)	Sigma-Aldrich	D9542
	Nuclease-free water (NF Water)	Ambion	AM9937
	TE buffer, pH 8.0	Ambion	AM9858
	无水乙醇 (分析纯)	/	/
	MGIEasy 环化试剂盒	MGI	1000005259
	MGISEQ-2000RS 高通量测序试剂套装 (FCL PE100)	MGI	1000012554
	MGISEQ-2000RS 高通量测序试剂套装 (FCL PE150)	MGI	1000012555
	DNBSEQ-T7RS 高通量测序试剂套装 (FCL PE100) V3.0	MGI	940-000269-00
	DNBSEQ-T7RS 高通量测序试剂套装 (FCL PE150) V3.0	MGI	940-000268-00
	Qubit ssDNA Assay Kit	Invitrogen	Q10212
	Qubit dsDNA HS Assay Kit	Invitrogen	Q32854
核酸片段分析仪器配套的分析试剂	/	/	

类型	名称	推荐品牌	货号
耗材	1 mL 注射器	/	/
	合适规格的细胞滤网	/	/
	0.22 μm 滤膜	PALL	4612
	细胞计数板或血球计数板	INCYTO	DHC-N01
	1000 μL /200 μL /100 μL / 20 μL /10 μL 低吸附带滤芯盒装灭菌吸头	Axygen	/
	1000 μL /200 μL /100 μL /20 μL /10 μL 普通低吸附吸头	Axygen	/
	200 μL 阔口吸头	Axygen	T-205-WB-C
	低吸附 0.2 mL PCR 管	Axygen	PCR-02-L-C
	低吸附 1.5 mL 离心管	Eppendorf	0030108051
	0.2 mL PCR 管	Axygen	PCR-02-C
	0.2 mL 八联排	Axygen	PCR-0208-CP-C
	1.5 mL 离心管	Axygen	MCT-150-C
	15 mL 离心管	CORNING	430791
	50 mL 离心管	CORNING	430291
	Qubit Assay Tubes 或 0.5 mL 透明薄壁 PCR 管	Invitrogen; Axygen	Q32856; PCR-05-C

1.7 文库制备操作全流程概览

DNBelab C 系列高通量单细胞 RNA 文库制备试剂盒套装 V3.0 全流程测试共需耗时约 12 小时。各环节操作耗时及停止点如下表所示：

表 5 实验全流程概览

操作步骤	时长	停止点及保存方式
1. 样本处理	~60 分钟	/
制备细胞(核)悬浮液及细胞计数	~60 分钟	/
2. 液滴生成	~30 分钟	/
准备样本相悬浮液，准备磁珠相悬浮液	~15 分钟	/
装载载片，进行液滴生成	~15 分钟	/

操作步骤	时长	停止点及保存方式
3. 液滴内 RT 反应	~160 分钟	/
进行液滴回收	~10 分钟	/
RT 反应	~150 分钟	II 停止点 RT 结束后, 可将回收的液滴在 2 °C ~ 8 °C 下放置 24 小时。
4. 破乳及 RT 产物分选	~60 分钟	/
破乳回收	~20 分钟	/
磁珠分选	~40 分钟	II 停止点 “cDNA 中间产物” 可在 -25 °C ~ -15 °C 条件下保存 1 周。 “Oligo 产物 2” 可在 -25 °C ~ -15 °C 条件下保存 6 个月。
5. cDNA 中间产物扩增及纯化	~140 分钟	/
cDNA 扩增	~100 分钟	II 停止点 cDNA 扩增产物在 2 °C ~ 8 °C 条件下最多保存 24 小时, 在 -25 °C ~ -15 °C 条件下最多保存 1 周。
cDNA 产物纯化	~20 分钟	II 停止点 纯化产物可在 -25 °C ~ -15 °C 条件下保存 6 个月。
cDNA 扩增产物定量及片段质检	~20 分钟	/
6. Oligo 文库构建 (可同时)	~90 分钟	/
Oligo 文库构建	~40 分钟	/
Oligo 文库片段筛选	~30 分钟	II 停止点 Oligo 文库可在 -25 °C ~ -15 °C 条件下保存 6 个月。
Oligo 文库定量及片段质检	~20 分钟	/
7. cDNA 文库构建	~195 分钟	/
片段化及末端修复	~35 分钟	/
接头连接	~20 分钟	/
接头连接产物纯化及片段筛选	~50 分钟	II 停止点 连接产物纯化后可在 -25 °C ~ -15 °C 条件下保存 24 小时。
PCR 扩增	~40 分钟	/

操作步骤	时长	停止点及保存方式
PCR 扩增产物筛选	~30 分钟	 停止点 cDNA 文库可在 -25 °C ~ -15 °C 条件下保存 6 个月。
cDNA 文库定量及片段质检	~20 分钟	/

1.8 注意事项

请遵循如下注意事项：

- 本产品仅用于科研用途，不用于临床诊断，使用前请仔细阅读本说明书。
- 实验前，须熟悉和掌握需使用的试剂及仪器的操作方法和注意事项。
- 文库制备流程建议根据具体的实验设计、样本特征、测序应用和设备进行调整和优化。本说明书提供的实验流程是通用的，可根据需要调整反应参数，以优化性能与效率。
- 试剂套装各组分使用前取出。其中，Enzyme 需瞬时离心后置于冰上待用，其他组分于冰上解冻，解冻后上下颠倒数次充分混匀，瞬时离心后置于冰上待用。
- 为避免样本交叉污染及实验操作失败，样本处理、液滴生成、逆转录、破乳、cDNA 扩增等实验操作推荐在洁净实验室中进行。同时，使用低吸附带滤芯的吸头吸取不同样本时，须更换吸头。
- 建议在带热盖的 PCR 仪中进行各步骤反应，使用前应预热 PCR 仪至反应温度。
- PCR 产物极易因操作不当产生气溶胶污染，进而影响实验结果准确性。因此，建议将 PCR 反应体系配制区和 PCR 产物纯化检测区进行强制性的物理隔离，使用专用的移液器等设备，并定时使用 0.5% 次氯酸钠或 10% 漂白剂对各实验区域进行擦拭清洁，以保证实验环境的洁净度。
- 所有样本及试剂应避免直接接触皮肤和眼睛，切勿吞咽。一旦发生这种情况，立即用大量清水冲洗并及时到医院就诊。
- 所有样本和废弃物均应按相关法规规定处理。
- 若有其他疑问，请联系技术支持：MGI-service@mgi-tech.com

第 2 章 样本要求及处理

本章介绍样本要求及处理情况，包括实验前的准备及注意事项、样本要求、以及准备实验室、准备试剂和制备细胞悬浮液及计数细胞的过程。

2.1 注意事项

请遵循如下注意事项：

- 单细胞实验建议在 10 万或 30 万级洁净实验室内或超净台内操作。

- 在超净台内操作单细胞 RNA 实验时，需避免外源核酸污染。
- 实验人员须严格佩戴口罩及一次性无粉乳胶手套。操作过程中，禁止手腕部分的皮肤裸露。若手套接触超净台外的区域，需用 RNase-Zap 仔细擦拭手套表面后方可继续实验。
- 实验中所有样本均要求置于冰盒上。
- 实验中所用吸头、离心管、无菌水等耗材必须无菌、无核酸、无核酸酶。吸头必须为低吸附带滤芯无核酸酶的吸头。耗材必须为专项专用，不得他用。

2.2 实验前准备

2.2.1 样本要求

表 6 样本要求

细胞（核）大小	推荐直径小于 60 μm
推荐细胞（核）投入量	投入总量 5000-30000 个 <ul style="list-style-type: none"> • 细胞系样本：上样量 5000~30000 个 • PBMC 样本、其他组织解离样本：上样量 10000~30000 个
细胞要求	<ul style="list-style-type: none"> • 细胞活性大于 80% • 结团率小于 5% • 杂质率小于 5%
细胞核要求	<ul style="list-style-type: none"> • 细胞活性小于 5% • 结团率小于 5% • 杂质率小于 5%

表 7 细胞（核）投入推荐

目的投入细胞（核）数(个)	推荐细胞（核）浓度(个/ μL)
5000	145<N<1000
10000	275<N<2000
20000	550<N<2000
30000	825<N<2000

表 8 细胞捕获及多胞率参考 (以人鼠细胞系为例)

细胞投入量 (个)	捕获细胞数 (个)	Multiplet Rate(%)
5000	>3000	1.19%
10000	>6000	2.61%
20000	>12000	4.06%
30000	>18000	6.37%

-  提示
- N 表示细胞 (核) 浓度。
 - 建议计数细胞浓度时, 计数活细胞的浓度。

2.2.2 实验室要求

- 开始实验前, 先用 RNase-Zap 仔细擦拭手套, 然后用 RNase-Zap 擦拭移液器、实验台面和仪器。着重擦拭移液器及实验台操作面。
- 若使用超净台, 需提前打开超净台照明灯并进行下列操作:
 - 1) 使用 DNA-OFF 对超净台操作台面和仪器进行全面擦拭, 特别是金属、塑料制品表面。
 - 2) 等待 10 分钟, 降解 DNA, 然后关闭照明灯。
 - 3) 打开紫外照射以杀菌, 至少持续 15 分钟。
 - 4) 完成后打开照明灯和风机。

2.2.3 准备试剂

准备下列试剂:

- PBS (含 10%BSA)

表 9 配制 PBS (含 10% BSA)

试剂名称	用量
BSA 粉末	1 g
PBS (不含 Ca ²⁺ , Mg ²⁺)	定容至 10 mL

充分溶解后, 使用注射器和 0.22 μm 滤膜过滤。

-  提示 此试剂在 -25 °C ~ -15 °C 条件下最多可保存 6 个月。

- PBS (含 0.04% BSA)

表 10 配制 PBS (含 0.04% BSA)

试剂名称	用量
PBS (不含 Ca ²⁺ , Mg ²⁺)	49.8 mL
PBS (含 10% BSA)	200 μ L

按比例加入所需量并混匀。

 提示 此试剂在 2 °C ~ 8 °C 条件下最多可保存 1 个月。

2.3 制备细胞(核)悬浮液

操作步骤如下：

1. 采用恰当的方法制备单细胞（核）悬液，并用 PBS（含 0.04% BSA）清洗 2 次。
2. 用适量体积的 PBS（含 0.04% BSA）重悬细胞（核）。
3. 使用小于 60 μ m 合适规格的细胞筛过滤后测细胞（核）悬液浓度并记录。

 提示

- 推荐使用阔口吸头吹吸混匀细胞样本。
- 用细胞计数板或血球计数板检测细胞浓度，计数务必准确，否则将影响最终得率。建议至少重复计数三次。

第 3 章 液滴生成

本章介绍通过 DNBelab C 系列高通量单细胞 RNA 文库制备试剂盒套装 V3.0(TaiM 4)将细胞（核）悬液制备成液滴。整个过程耗时约 30 分钟。

3.1 实验前准备

3.1.1 准备试剂与设备

表 11 准备清单

类型	试剂盒种类	组分信息	管盖颜色	规格及数量	
				16RXN	4RXN
试剂	DNBelab C 系列高通量单细胞 RNA 文库制备试剂盒 V3.0 (盒 1 液滴生成) (货号: 940-001820-00, 16RXN) (货号: 940-001927-00, 4RXN)	Cell Beads-V3	本色	560 μ L/管 \times 2	280 μ L/管 \times 1
		Index Carrier	本色	280 μ L/管 \times 2	140 μ L/管 \times 1
		Lysis Buffer-V3	本色	72 μ L/管 \times 2	36 μ L/管 \times 1
		P100 Oil	本色	7.6 mL/瓶 \times 2	3.8 mL/瓶 \times 1
	DNBelab C 系列高通量单细胞 RNA 文库制备试剂盒 V3.0 (盒 2 液滴生成) (货号: 940-001819-00, 16RXN) (货号: 940-001929-00, 4RXN)	Beads Buffer	本色	728 μ L/管 \times 2	364 μ L/管 \times 1
		Cell Solution-V3	本色	142 μ L/管 \times 2	71 μ L/管 \times 1
		RT Primer-V3	本色	33 μ L/管 \times 2	17 μ L/管 \times 1
		DIR Reagent-V3	本色	13 μ L/管 \times 2	7 μ L/管 \times 1
		RNase Inhibitor	本色	132 μ L/管 \times 2	66 μ L/管 \times 1
	DNBelab C 系列载片(TaiM 4) (货号: 940-001822-00, 16RXN) (货号: 940-001928-00, 4RXN)	载片	/	16 个/盒 \times 1	4 个/盒 \times 1
		密封垫	/	5 件/袋 \times 1	2 件/袋 \times 1
	设备	DNBelab C-TaiM 4 液滴生成仪 (货号: 900-000637-00)	/	/	1

-  提示
- 提前取出 P100 Oil 并置于室温平衡至少 30 分钟。
 - 提前将 Lysis Buffer-V3 取出，室温平衡至溶液中的晶体全部溶解。
 - Cell Beads-V3、Index Carrier、RT Enzyme-V3、RNase Inhibitor 以及配制完成的样本相、磁珠相悬浮液，均勿涡旋混匀。
 - 本章涉及到的实验步骤需使用低吸附带滤芯吸头及低吸附离心管。

3.1.2 准备样本相悬浮液

-  提示 配制体系时应适当增加配液量，以避免液滴生成时样本相悬浮液加液量不足 80 μ L。

操作步骤如下：

用移液器轻轻吹吸混匀第 12 页“2.3 制备细胞(核)悬浮液”中准备好的细胞(核)悬浮液。按下表配制样本相悬浮液。配制完成后，放置冰上待用。

表 12 样本相悬浮液体系

组分	单个反应体积(μL)
Cell Solution-V3	17.7
RT Primer-V3	4
DIR Reagent-V3	1.6
RNase Inhibitor	16.5
RT Enzyme-V3	8
PBS (含 0.04% BSA)	32.2-X
细胞悬浮液	X
总体积	80

-  提示
- “X”代表细胞(核)悬浮液的体积。
 - 配制的样本相悬浮液，可在即将加入液滴生成仪前进行吹吸混匀，混匀后直接加样进行液滴生成。在这之前均无需多次进行吹吸，以减少损耗，避免体系不足上样量要求。
 - 细胞(核)投入总量范围可在 5000~30000，细胞体积最多为 32.2 μL，加入体积可根据细胞(核)浓度调整，剩下体积用 PBS (含 0.04% BSA) 补充。
 - 对于刚刚复苏或者较脆弱的细胞样本，用阔口吸头吹吸混匀。
 - 若有多个样本，可在低吸附 1.5 mL 离心管中合并处理。
 - RT Enzyme-V3 和细胞应在即将上液滴生成仪前加入。

3.1.3 准备磁珠相悬浮液

-  提示
- 此步骤需在超净台中进行。
 - 为避免液滴生成时磁珠相悬浮液加液量不足 100 μL，应在配制体系时适当增加配液量。

操作步骤如下：

- 取出 Cell Beads-V3 和 Index Carrier，上下颠倒或吹吸至完全混匀。
- 吸取单份样本用量 70 μL Cell Beads-V3 以及 35 μL Index Carrier 到 0.2 mL 低吸附 PCR 管中。
- 将 PCR 管置于磁力架上静置 3-5 分钟，缓慢弃掉上清，避免损失磁珠。
- 从磁力架上取下 PCR 管，依次加入 91 μL Beads Buffer 和 9 μL Lysis Buffer-V3。磁珠相悬浮液配制体系如下表。配制完成后，放置冰上待用。

表 13 磁珠相悬浮液体系

组分	单个反应体积(μL)	备注
Cell Beads-V3	70	弃上清
Index Carrier	35	
Beads Buffer	91	/
Lysis Buffer-V3	9	/
总体积	100	

-  提示
- 如果有多个样本需要跑多张载片，可以在一个 1.5 mL 低吸附离心管中合并配制磁珠相悬浮液。
 - 重悬好的磁珠相应在 20 分钟内上液滴生成仪进行液滴生成。
 - 配制的磁珠相悬浮液，可在即将加入液滴生成仪前进行吹吸混匀，混匀后直接加样进行液滴生成。在这之前均无需多次进行吹吸，以减少损耗，避免体系不足上样量要求。

3.2 进行液滴生成

操作步骤如下：

1. 准备载片。

-  警告
- 打开载片包装后请立即使用，避免灰尘掉入载片孔位，造成堵塞。
 - 如载片不慎跌落碎裂，请小心处理，避免划伤。

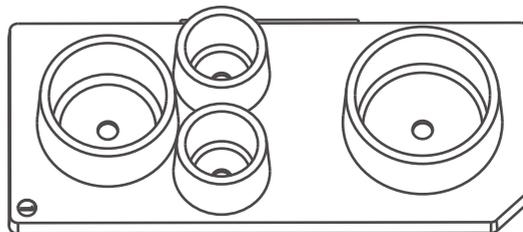


图 1 载片

2. 打开液滴生成仪电源，点击主界面【开门】，打开载片仓门。

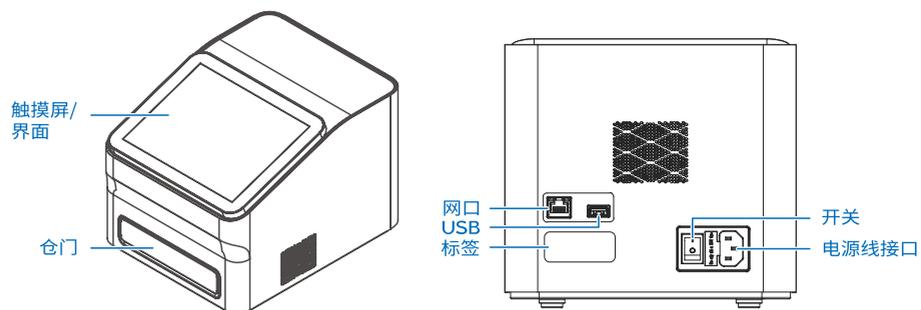


图 2 单细胞液滴生成仪前视图（左）、后视图（右）

3. 拨开载片载板上的卡扣。

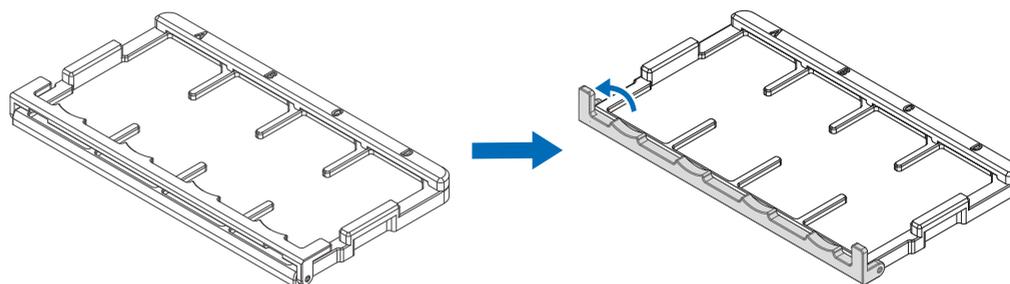


图 3 拨开卡扣

4. 将载片放入载片载板的卡槽中，确保载片右上角的缺口与卡槽右上角的缺口处重合。根据需要依次在其他卡槽中放入载片。

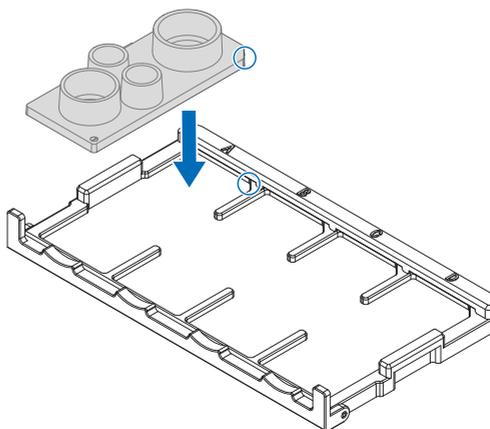


图 4 装载载片

5. 将密封垫放在载片收集孔上。可根据装载载片数量自行裁剪所需密封垫的数量。

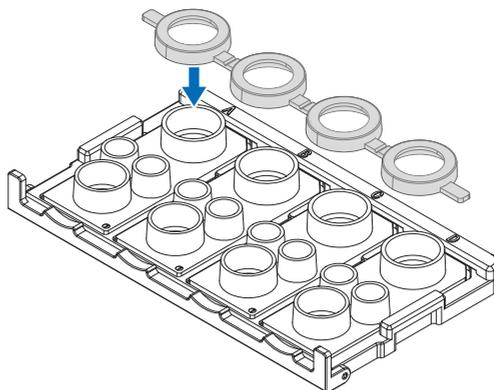


图 5 放置密封垫

 提示 每个载片放置一个密封垫。

6. 合上载片载板的卡扣，确保载片固定在载板上。
7. 将装有载片的载板放入载片仓的卡槽内。

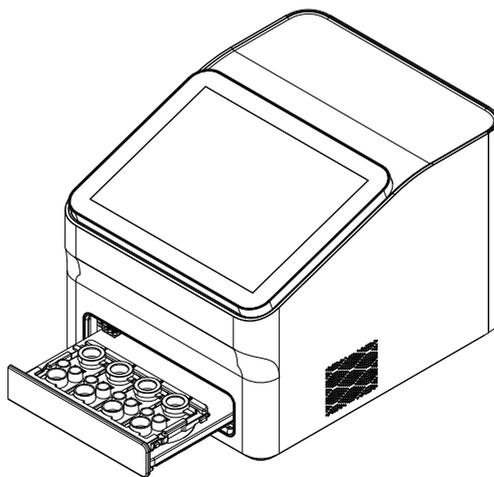


图 6 载片载板放入载片仓

8. 按顺序依次加入样本相悬浮液、P100 Oil、磁珠相悬浮液至相应孔内。

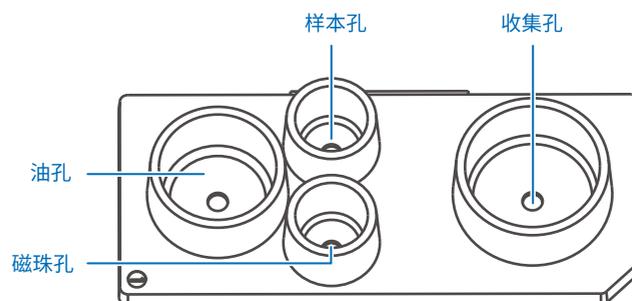


图 7 载片孔位

表 14 载片加液

顺序	溶液	加入量 (μL)	孔位
1	样本相悬浮液	80	样本孔
2	P100 Oil	950	油孔
3	磁珠相悬浮液	100	磁珠孔

-  提示
- 样本相悬浮液和磁珠相悬浮液加样前充分吹打混匀。吹吸时避免产生气泡。加样时，吸头勿悬空，抵住底部进液孔缓缓加入。需注意将进液孔充满，以保证液滴生成的顺利进行。
 - 三个加液孔的加液总时长尽量控制在 1 分钟以内。
 - 严格按照先加样本相悬浮液、再加 P100 Oil、最后加磁珠相悬浮液的顺序，否则会造成液滴生成失败。
 - 在进行多个样本（例如 4 个样本）的液滴生成时，可依次将 4 个样本的样本相悬浮液加入，再依次加入 4 个样本的 P100 Oil，最后依次加入 4 个样本的磁珠相悬浮液，然后一起进行液滴生成。

9. 点击主界面【关门】，关闭载片仓门。
10. 点击反应类型【RNAV3】，点击载片对应的通道，再点击主界面 ，液滴生成反应开始。

-  提示 界面中的通道“ A、B、C、D”与载片载板中的 A、B、C、D”一一对应。



图 8 液滴生成反应开始

11. 反应完成后，在弹框中点击【好的】，再点击主界面【开门】，打开载片仓门。



图 9 液滴生成反应完成

12. 取走密封垫，打开卡扣，取出载片，进行液滴回收。



- 提示
- 液滴生成完成后，应及时进行液滴回收操作，避免因长时间放置在空气中，收集孔中的液滴被蒸干，或者液滴挂在收集孔壁上造成样本损失。
 - 有关单细胞液滴生成仪的维护与保养，详见 *DNBelab C-TaiM 4RS 单细胞液滴生成仪产品说明书*。

第 4 章 液滴内 RT 反应

本章介绍液滴生成结束后回收液滴，进行液滴内 RT 的过程，耗时约 2 小时 40 分钟。

4.1 实验前准备

表 15 试剂准备清单

试剂盒种类	组分信息	管盖颜色	规格及数量	
			16RXN	4RXN
DNBelab C 系列 高通量单细胞 RNA 文库制备试剂盒 V3.0 (盒 1 液滴生成) (货号：940-001820-00, 16RXN) (货号：940-001927-00, 4RXN)	Cover Oil	本色	3.2 mL/瓶×2	1.6 mL/瓶×1



提示 提前取出 Cover Oil 并置于室温平衡至少 30 分钟。

4.2 进行液滴回收及 RT 反应

操作步骤如下：

1. 取一个干净 PCR 八联排，用马克笔做好标记。

 提示 一个样本对应一个 PCR 八联排。

2. 使用 200 μL 低吸附吸头从载片的收集孔中轻缓吸取全部液滴（可侧倾载片以便收集液滴），吸头悬空垂直静置数秒，等待液滴漂浮至油相上层，轻缓将底部油相打入 PCR 八联排后 4 管，再将液滴转移至 PCR 八联排前 4 管，重复这一步骤，直至转移完全部液滴。

 提示

- PCR 八联排前 4 个管子装载一个样品的全部液滴，后 4 个管子装载 P100 Oil。转移液滴时保持动作轻缓，猛烈地吹打会导致液滴破碎。
- 将一个样品的液滴均匀分装至前 4 个 PCR 管内，每管的体积大约 50 μL ~ 100 μL 。
- 使用 PCR 八联排后 4 管中的油相清洗收集孔中残留液滴（切忌吹吸），并转移至 PCR 八联排前 4 管内，以尽可能回收全部液滴。
- 液滴生成后放置不要超过 30 分钟，否则会影响数据质量。

3. 液滴转移完之后，在 PCR 八联排前 4 管液滴表面加 100 μL Cover Oil 覆盖。

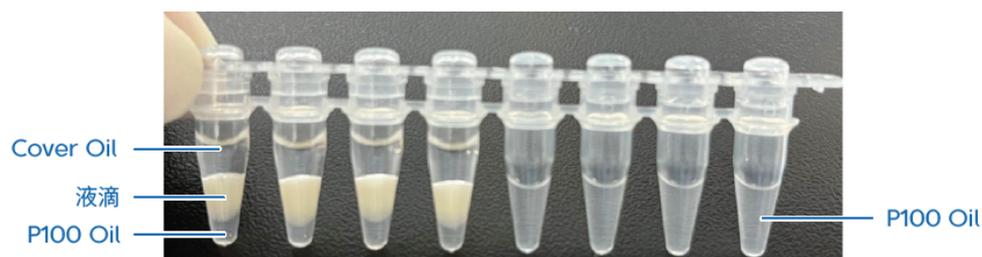


图 10 液滴回收

 提示 八联排前 4 管内液体分为 3 层：最上层为 Cover Oil、中间层为液滴、最下层为 P100 Oil（少量或无）。

4. 按下表中的条件在 PCR 仪上开始逆转录反应。

表 16 液滴内 RT 反应条件（反应体系 100 μ L）

温度	时间	循环数
70 °C（热盖）	On	/
42 °C	90 分钟	1
50 °C	2 分钟	10
42 °C	2 分钟	
85 °C	5 分钟	1
4 °C	Hold	/

II 停止点 RT 结束后，可将回收的液滴在 2 °C~8 °C 下放置 24 小时。

第 5 章 破乳及 RT 产物分选

本章主要描述破乳回收 RT 产物的过程，耗时约 1 小时。

- 提示**
- 提前取出 DNA Clean Beads，并置于室温平衡至少 30 分钟，涡旋混匀后使用。
 - 试剂 Breakage Reagent 应在通风橱内使用。

5.1 实验前准备

表 17 试剂准备清单

试剂盒种类	组分信息	管盖颜色	规格及数量	
			16RXN	4RXN
DNBelab C 系列 高通量单细胞 RNA 文库制备试剂盒 V3.0 (盒 1 液滴生成) (货号：940-001820-00, 16RXN) (货号：940-001927-00, 4RXN)	Breakage Reagent	棕色	800 μ L/管 \times 2	400 μ L/管 \times 1
	DNA Clean Beads	本色	8.352 mL/瓶 \times 2	4.176 mL/瓶 \times 1

5.2 进行破乳回收及磁珠分选

- 提示** 此章节破乳回收及磁珠分选的操作有 2 种方案，可选择其中一种进行。

5.2.1 方案一

5.2.1.1 进行破乳回收

操作步骤如下：

1. RT 反应结束后，将 PCR 前 4 管中间层的液滴全部转移到干净的新的低吸附 1.5 mL 离心管中。

 提示 转移液滴时避免吸取到上层 Cover Oil，吸到下层 P100 Oil 不会造成影响。

2. 向离心管中先加入 100 μL Breakage Reagent，再加入 200 μL NF Water，上下颠倒 15 ~ 20 次，室温静置 3 分钟。
3. 将离心管 1000 \times g，室温离心 2 分钟。
4. 将离心管置于磁力架上，静置 3~5 分钟。
5. 缓慢吸取 300 μL 水相至新的低吸附 1.5 mL 离心管中。若吸取的水相体积不足 300 μL ，则用 NF Water 补至 300 μL 。

 提示 吸取水相时，将吸头轻缓插入水相层并保持介于水油界面层以上，避免吸取到下层的 P100 Oil 和中间的水油界面层。

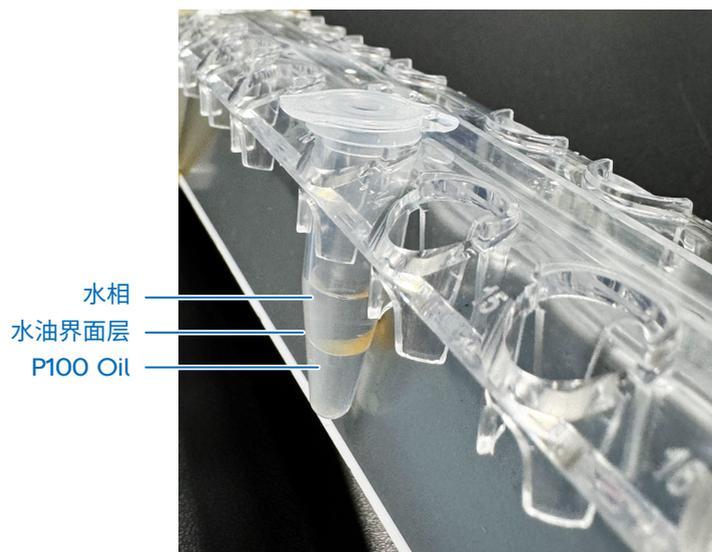


图 11 破乳回收水相

5.2.1.2 进行磁珠分选

-  提示
- 提前取出 DNA Clean Beads，并置于室温平衡至少 30 分钟，涡旋混匀后使用。
 - 操作前请仔细阅读第 43 页“附录 1 关于 DNA Clean Beads 及纯化”。

操作步骤如下：

1. 吸取 180 μL (0.6 \times) DNA Clean Beads 至第 22 页“5.2.1.1 进行破乳回收”步骤 5 的水相中，并用移液器轻轻吹吸至完全混匀，最后一次应确保将吸头中所有液体及磁珠都打入离心管中。
2. 将离心管置于室温孵育 5 分钟。
3. 将离心管瞬时离心并置于磁力架上，静置 2 ~ 5 分钟至液体澄清。
4. 用移液器将上一步的上清转移到新的低吸附 1.5 mL 离心管中，标记为“Oligo 产物 1”；将上一步吸附的磁珠继续下一步的纯化。



- 提示
- 此步保留上清，切记不要丢弃上清。
 - 注意不要吸到磁珠。

5. 保持离心管在磁力架上，向管中加入 700 μL 新鲜配制的 80% 乙醇，漂洗磁珠及管壁，静置 30 秒，弃掉上清。
6. 重复上一步，尽量吸干管内液体。有少量液体残留在管壁时可将离心管瞬时离心，在磁力架上分离后，用小量程的移液器将管底液体吸干。
7. 保持离心管在磁力架上，打开管盖，室温干燥，直至磁珠表面无反光、无开裂。



提示 切勿过度干燥，防止磁珠开裂。

8. 将离心管从磁力架上取下，加入 48 μL NF Water，并用移液器吹吸至完全混匀。
9. 将离心管置于室温下孵育 5 分钟。
10. 将离心管瞬时离心并置于磁力架上，静置 2~5 分钟至液体完全澄清，将 46 μL 上清转移到新的 PCR 管中，标记为“cDNA 中间产物”，进行 cDNA 中间产物扩增及纯化过程。具体操作，参考第 25 页“第 6 章 cDNA 中间产物扩增及纯化”。



停止点 “cDNA 中间产物”可在 -25 $^{\circ}\text{C}$ ~ -15 $^{\circ}\text{C}$ 条件下保存 1 周。

11. 向步骤 4 留存的“Oligo 产物 1”中，加入 240 μL (0.8 \times) DNA Clean Beads，并用移液器轻轻吹吸至完全混匀，最后一次应确保将吸头中所有液体及磁珠都打入离心管中。
12. 将离心管置于室温孵育 5 分钟。
13. 将离心管瞬时离心并置于磁力架上，静置 2 ~ 5 分钟至液体澄清，弃掉上清。
14. 保持离心管在磁力架上，向管中加入 700 μL 新鲜配制的 80% 乙醇，漂洗磁珠及管壁，静置 30 秒，弃掉上清。
15. 重复上一步，尽量吸干管内液体。有少量液体残留在管壁时可将离心管瞬时离心，在磁力架上分离后，用小量程的移液器将管底液体吸干。
16. 保持离心管在磁力架上，打开管盖，室温干燥，直至磁珠表面无反光、无开裂。



提示 切勿过度干燥，防止磁珠开裂。

17. 将离心管从磁力架上取下，加入 65 μL NF Water，并用移液器吹吸至完全混匀。
18. 将离心管置于室温下孵育 5 分钟。
19. 将离心管瞬时离心并置于磁力架上，静置 2~5 分钟至液体完全澄清，将 63 μL 上清转移到新的 1.5 mL 离心管中，标记为“Oligo 产物 2”。

II 停止点 “Oligo 产物 2” 可在 -25 °C ~ -15 °C 条件下保存 6 个月。

5.2.2 方案二

5.2.2.1 进行破乳回收

操作步骤如下：

1. RT 反应结束后，将 PCR 前 4 管中间层的液滴全部转移到干净的新的低吸附 1.5 mL 离心管中。

 提示 转移液滴时避免吸取到上层 Cover Oil，吸到下层 P100 Oil 不会造成影响。

2. 向离心管中先加入 100 μ L Breakage Reagent，上下颠倒 15 ~ 20 次，室温静置 3 分钟。

3. 将离心管 1000 \times g，室温离心 2 分钟。

4. 向离心管中加入 300 μ L DNA Clean Beads，上下颠倒混匀。

5. 将离心管置于室温孵育 5 分钟。

6. 将离心管瞬时离心并置于磁力架上，静置 2 ~ 5 分钟至液体澄清，弃掉上清。

7. 保持离心管在磁力架上，向管中加入 700 μ L 新鲜配制的 80%乙醇，漂洗磁珠及管壁，静置 30 秒，弃掉上清。

8. 重复上一步，尽量吸干管内液体。有少量液体残留在管壁时可将离心管瞬时离心，在磁力架上分离后，用小量程的移液器将管底液体吸干。

9. 保持离心管在磁力架上，打开管盖，室温干燥，直至磁珠表面无反光、无开裂。

 提示 切勿过度干燥，防止磁珠开裂。

10. 将离心管从磁力架上取下，加入 102 μ L NF Water，并用移液器吹吸至完全混匀。

11. 将离心管置于室温下孵育 5 分钟。

12. 将离心管瞬时离心并置于磁力架上，静置 2 ~ 5 分钟至液体完全澄清，将 100 μ L 上清转移到新的 1.5 mL 离心管中。

5.2.2.2 进行磁珠分选

 提示 • 提前取出 DNA Clean Beads，并置于室温平衡至少 30 分钟，涡旋混匀后使用。

• 操作前请仔细阅读第 43 页“附录 1 关于 DNA Clean Beads 及纯化”。

操作步骤如下：

1. 吸取 60 μ L (0.6 \times) DNA Clean Beads 至第 24 页“5.2.2.1 进行破乳回收”步骤 12 的离心管中，并用移液器轻轻吹吸至完全混匀，最后一次应确保将吸头中所有液体及磁珠都打入离心管中。

2. 将离心管置于室温孵育 5 分钟。

3. 将离心管瞬时离心并置于磁力架上，静置 2 ~ 5 分钟至液体澄清。

4. 用移液器将上一步的上清转移到新的低吸附 1.5 mL 离心管中，标记为“Oligo 产物 1”；将上一步吸附的磁珠继续下一步的纯化。
 -  提示
 - 此步保留上清，切记不要丢弃上清。
 - 注意不要吸到磁珠。
5. 保持离心管在磁力架上，向管中加入 700 μ L 新鲜配制的 80%乙醇，漂洗磁珠及管壁，静置 30 秒，弃掉上清。
6. 重复上一步，尽量吸干管内液体。有少量液体残留在管壁时可将离心管瞬时离心，在磁力架上分离后，用小量程的移液器将管底液体吸干。
7. 保持离心管在磁力架上，打开管盖，室温干燥，直至磁珠表面无反光、无开裂。
 -  提示 切勿过度干燥，防止磁珠开裂。
8. 将离心管从磁力架上取下，加入 48 μ L NF Water，并用移液器吹吸至完全混匀。
9. 将离心管置于室温下孵育 5 分钟。
10. 将离心管瞬时离心并置于磁力架上，静置 2~5 分钟至液体完全澄清，将 46 μ L 上清转移到新的 PCR 管中，标记为“cDNA 中间产物”，进行 cDNA 中间产物扩增及纯化过程。具体操作，参考第 25 页“第 6 章 cDNA 中间产物扩增及纯化”。
-  停止点 “cDNA 中间产物”可在-25 $^{\circ}$ C ~ -15 $^{\circ}$ C条件下保存 1 周。
11. 向步骤 4 留存的“Oligo 产物 1”中，加入 80 μ L (0.8 \times) DNA Clean Beads，并用移液器轻轻吹吸至完全混匀，最后一次应确保将吸头中所有液体及磁珠都打入离心管中。
12. 将离心管置于室温孵育 5 分钟。
13. 将离心管瞬时离心并置于磁力架上，静置 2 ~ 5 分钟至液体澄清，弃掉上清。
14. 保持离心管在磁力架上，向管中加入 700 μ L 新鲜配制的 80%乙醇，漂洗磁珠及管壁，静置 30 秒，弃掉上清。
15. 重复上一步，尽量吸干管内液体。有少量液体残留在管壁时可将离心管瞬时离心，在磁力架上分离后，用小量程的移液器将管底液体吸干。
16. 保持离心管在磁力架上，打开管盖，室温干燥，直至磁珠表面无反光、无开裂。
 -  提示 切勿过度干燥，防止磁珠开裂。
17. 将离心管从磁力架上取下，加入 65 μ L NF Water，并用移液器吹吸至完全混匀。
18. 将离心管置于室温下孵育 5 分钟。
19. 将离心管瞬时离心并置于磁力架上，静置 2~5 分钟至液体完全澄清，将 63 μ L 上清转移到新的 1.5 mL 离心管中，标记为“Oligo 产物 2”。
-  停止点 “Oligo 产物 2”可在-25 $^{\circ}$ C ~ -15 $^{\circ}$ C条件下保存 6 个月。

第 6 章 cDNA 中间产物扩增及纯化

本章主要描述 cDNA 中间产物扩增以及对扩增产物进行纯化的过程。耗时约 2 小时 20 分钟。

6.1 实验前准备

表 18 试剂准备清单

试剂盒种类	组分信息	管盖颜色	规格及数量	
			16RXN	4RXN
DNBelab C 系列 高通量单细胞 RNA 文库制备试剂盒 V3.0 (盒 1 液滴生成) (货号: 940-001820-00,16RXN) (货号: 940-001927-00,4RXN)	DNA Clean Beads	本色	8.352 mL/ 瓶 ×2	4.176 mL/ 瓶 ×1
	cDNA Amp Enzyme	本色	400 μL/ 管 ×2	200 μL/ 管 ×1
DNBelab C 系列 高通量单细胞 RNA 文库制备试剂盒 V3.0 (盒 2 液滴生成) (货号: 940-001819-00,16RXN) (货号: 940-001929-00,4RXN)	cDNA Amp Primer-V3	本色	33 μL/ 管 ×2	17 μL/ 管 ×1

 提示 提前取出 DNA Clean Beads，并置于室温平衡至少 30 分钟，涡旋混匀后使用。

6.2 进行 cDNA 扩增

操作步骤如下：

1. 按下表在冰上配制 cDNA 扩增反应体系。

表 19 cDNA 扩增反应体系

组分	单个反应体积(μL)
cDNA Amp Enzyme	50
cDNA Amp Primer-V3	4
cDNA 中间产物	46
总体积	100

2. 将配制好的反应体系涡旋混匀，并瞬时离心。
3. 按下表中的条件在 PCR 仪上开始 cDNA 扩增反应。

表 20 cDNA 扩增反应条件 (反应体系 100 μ L)

温度	时间	循环数
105 $^{\circ}$ C (热盖)	On	/
95 $^{\circ}$ C	3 分钟	1
98 $^{\circ}$ C	20 秒	X
65 $^{\circ}$ C	30 秒	
72 $^{\circ}$ C	3 分钟	
72 $^{\circ}$ C	5 分钟	1
4 $^{\circ}$ C	Hold	/

 提示 针对不同样本和不同的细胞投入量, PCR 循环数不同:

- 对于细胞系样本 (投入 10000~20000), 建议采用 11~13 个循环。
- 对于 PBMC 样本 (投入 10000~20000), 建议采用 13~15 个循环。
- 针对实体组织来源的细胞 (核) (投入 10000~20000), 根据样本情况采用 15~20 个循环。

 停止点 cDNA 扩增产物在 2 $^{\circ}$ C ~8 $^{\circ}$ C 条件下最多保存 24 小时, 在 -25 $^{\circ}$ C ~-15 $^{\circ}$ C 条件下最多保存 1 周。

6.3 cDNA 产物纯化

 提示

- 提前取出 DNA Clean Beads, 并置于室温平衡至少 30 分钟, 涡旋混匀后使用。
- 操作前请仔细阅读第 43 页“附录 1 关于 DNA Clean Beads 及纯化”。

操作步骤如下:

1. 用移液器吸取体积 60 μ L (0.6 \times) DNA Clean Beads 至第 26 页“6.2 进行 cDNA 扩增”步骤 3 的 cDNA 扩增产物中。
2. 轻轻吹吸至完全混匀, 最后一次应确保将吸头中所有液体及磁珠都打入离心管中。
3. 室温孵育 5 分钟。
4. 瞬时离心后, 将 PCR 管置于磁力架上, 静置 2~5 分钟, 至液体澄清, 弃掉上清。
5. 保持 PCR 管在磁力架上, 加入 200 μ L 新鲜配制的 80%乙醇, 漂洗磁珠及管壁, 静置 30 秒, 弃掉上清。
6. 重复上一步, 尽量吸干管内液体, 有少量残留在管壁时可将离心管瞬时离心, 在磁力架上分离后, 用小量程的移液器将管底液体吸干。
7. 保持 PCR 管在磁力架上, 打开管盖, 室温干燥, 直至磁珠表面无反光、无开裂。

 提示 切勿过度干燥, 防止磁珠开裂。

8. 将离心管从磁力架上取下，加入 32 μL NF Water 洗脱 cDNA，用移液器轻轻吹吸至完全混匀。
9. 室温下孵育 5 分钟。
10. 瞬时离心后，将 PCR 管置于磁力架上，静置 2~5 分钟至液体完全澄清，将 30 μL 上清液转移到新的 1.5 mL 离心管中，标记为“cDNA 产物”。
11. 取 1 μL cDNA 产物使用 Qubit dsDNA HS Assay Kit 检测浓度。取适量 cDNA 产物检测片段分布。

参考值：cDNA 浓度大于 10 $\text{ng}/\mu\text{L}$ ，片段分布在 600 bp~ 2000 bp 之间，如下图所示。

 提示 该参考值为使用标准人源 PBMC 测试所得。对于不同类型样本，cDNA 产物浓度可能存在差异。

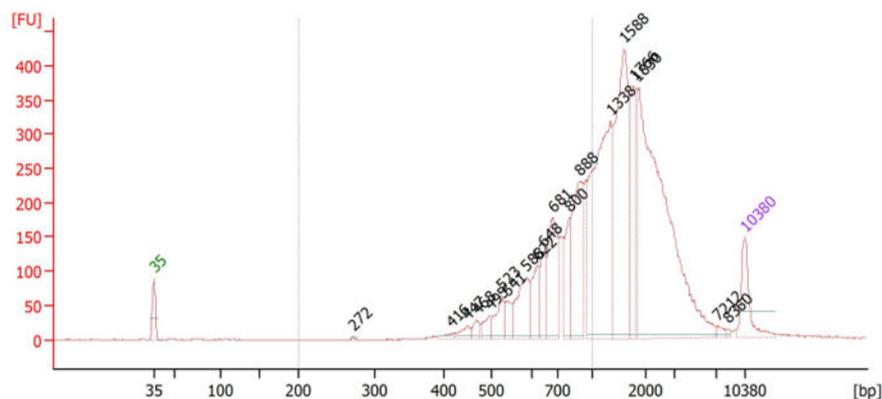


图 12 cDNA 产物片段分布图（使用 2100 片段分析仪检测参考图）

 停止点 纯化产物可在 -25 $^{\circ}\text{C}$ ~ -15 $^{\circ}\text{C}$ 条件下保存 6 个月。

第 7 章 Oligo 产物文库构建操作流程

本章主要描述通过 PCR 将 Oligo 产物进行 Barcode 标记，制备成 Oligo 文库的过程。耗时约 1 小时 30 分钟。

7.1 实验前准备

表 21 试剂准备清单

试剂盒种类	组分信息	管盖颜色	规格及数量	
			16RXN	4RXN
DNBelab C 系列 高通量单细胞 RNA 文库制备试剂盒 V3.0 (盒 1 液滴生成) (货号: 940-001820-00, 16RXN) (货号: 940-001927-00, 4RXN)	DNA Clean Beads	本色	8.352 mL/瓶×2	4.176 mL/瓶×1
DNBelab C 系列 高通量单细胞 RNA 文库制备试剂盒 V3.0 (盒 3 文库制备) (货号: 940-001821-00, 16RXN) (货号: 940-001925-00, 4RXN)	PCR Amp Enzyme	本色	600 μL/管×2	300 μL/管×1
DNBelab C 系列 单细胞文库制备样本标签试剂盒 S (货号: 940-001920-00, 16RXN)	Barcode Primer-1~8	本色	八联排×2 组	/
	Barcode Primer-9~16	本色	八联排×2 组	/
	Barcode Primer-17~24	本色	八联排×2 组	/
	Barcode Primer-25~32	本色	八联排×2 组	/
DNBelab C 系列 单细胞文库制备样本标签试剂盒 S (货号: 940-001926-00, 4RXN)	Barcode Primer-1~8	本色	/	八联排×1 组
	Barcode Primer-9~16	本色	/	八联排×1 组

 提示 提前取出 DNA Clean Beads，并置于室温平衡至少 30 分钟，使用前应涡旋混匀。

7.2 Oligo 产物文库构建

操作步骤如下：

1. 取新的 0.2 mL PCR 管，取 21 μL 第 22 页“5.2.1.2 进行磁珠分选”或第 24 页“5.2.2.2 进行磁珠分选”步骤 19 中的“Oligo 产物 2”进行文库构建。配制体系如下表。

表 22 Oligo 产物文库构建体系

组分	单个反应体积(μL)
Oligo 产物 2	21
Barcode Primer	4
PCR Amp Enzyme	25
总体积	50

-  提示
- 操作前请仔细阅读第 44 页“附录 2 关于 Barcode Primer 使用”。
 - 记录下来每个样本加的 Barcode Primer 号。

- 将上一步骤中配制好的反应体系涡旋混匀，并瞬时离心。
- 按下表的条件构建 Oligo 文库。

表 23 Oligo 产物文库构建反应条件（反应体系 50 μL ）

温度	时间	循环数
105 $^{\circ}\text{C}$ (热盖)	On	/
95 $^{\circ}\text{C}$	3 分钟	1
98 $^{\circ}\text{C}$	15 秒	9
60 $^{\circ}\text{C}$	30 秒	
72 $^{\circ}\text{C}$	10 秒	
72 $^{\circ}\text{C}$	5 分钟	1
4 $^{\circ}\text{C}$	Hold	/

7.3 Oligo 文库片段筛选

-  提示
- 提前取出 DNA Clean Beads，并置于室温平衡至少 30 分钟，使用前应涡旋混匀。
 - 操作前请仔细阅读第 43 页“附录 1 关于 DNA Clean Beads 及纯化”。

操作步骤如下：

- 吸取 30 μL (0.6 \times) DNA Clean Beads 至 PCR 产物中，并用移液器轻轻吹吸至完全混匀，最后一次应确保将吸头中所有液体及磁珠都打入 PCR 管中。
- 室温孵育 5 分钟。
- 瞬时离心后，将 PCR 管置于磁力架上，静置 2~5 分钟，至液体澄清，用移液器小心吸取上清，并转移到新的 PCR 管中。

-  提示 此步保留上清，切勿丢弃上清。

4. 吸取 40 μL (0.8 \times) DNA Clean Beads 加到上一步 PCR 管的上清中，并用移液器轻轻吹吸至完全混匀，最后一次应确保将吸头中所有液体及磁珠都打入 PCR 管中。
5. 室温孵育 5 分钟。
6. 瞬时离心后，将 PCR 管置于磁力架上，静置 2~5 分钟，至液体澄清，弃掉上清。
7. 保持 PCR 管在磁力架上，加入 200 μL 新鲜配制的 80%乙醇，漂洗磁珠及管壁，静置 30 秒，弃掉上清。
8. 重复上一步，尽量吸干管内液体，有少量残留在管壁时可瞬时离心，在磁力架上分离后，用小量程的移液器将管底液体吸干。
9. 保持 PCR 管在磁力架上，打开管盖，室温干燥，直至磁珠表面无反光、无开裂。

 提示 切勿过度干燥，防止磁珠开裂。

10. 将离心管从磁力架上取下，加入 32 μL TE Buffer，并用移液器轻轻吹吸至完全混匀。
11. 室温下孵育 5 分钟。
12. 瞬时离心后，将 PCR 管置于磁力架上，静置 2~5 分钟至液体澄清，将 30 μL 上清转移到新的离心管中。
13. 取 1 μL 片段筛选后的产物使用 Qubit dsDNA HS Assay Kit 检测浓度。取适量片段筛选后的产物检测片段分布。

参考值：Oligo 文库浓度大于 10 ng/ μL ，片段分布在 180 ± 10 bp 左右（见下图）。

 提示 该参考值为使用标准人源 PBMC 测试所得。对于不同类型样本，文库浓度可能存在差异。

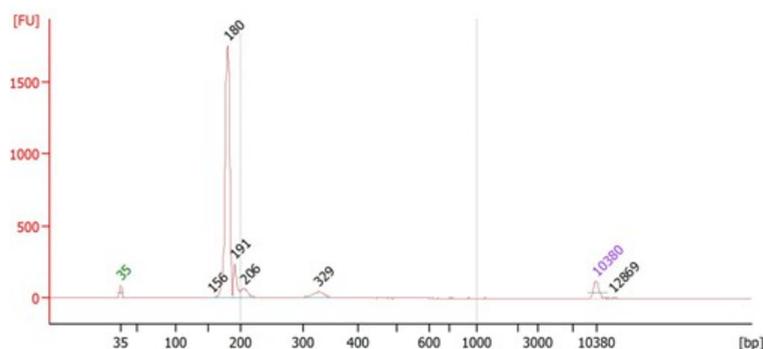


图 13 Oligo 文库片段分布图（使用 2100 片段分析仪检测参考图）

14. 用 Oligo 文库进行环化文库构建。详见第 37 页“8.7 环化文库构建（cDNA 文库和 Oligo 文库）”。

 停止点 Oligo 文库可在 $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ~ $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下保存 6 个月。

第 8 章 cDNA 文库构建操作流程

本章介绍 cDNA 产物制备成 cDNA 文库的过程。主要包括片段化及末端修复、接头连接、PCR 等，大约耗时 3 小时 15 分钟。

 提示 本章操作无须在超净台中进行。

8.1 实验前准备

表 24 试剂准备清单

试剂盒种类	组分信息	管盖颜色	规格及数量	
			16RXN	4RXN
DNBelab C 系列 高通量单细胞 RNA 文库制备试剂盒 V3.0 (盒 1 液滴生成) (货号: 940-001820-00,16RXN) (货号: 940-001927-00,4RXN)	DNA Clean Beads	本色	8.352 mL/瓶×2	4.176 mL/瓶×1
	Frag Enzyme-V3	本色	80 μL/管×2	40 μL/管×1
DNBelab C 系列 高通量单细胞 RNA 文库制备试剂盒 V3.0 (盒 3 文库制备) (货号: 940-001821-00,16RXN) (货号: 940-001925-00,4RXN)	Frag Buffer-V3	本色	40 μL/管×2	20 μL/管×1
	DNA Ligase-V3	本色	80 μL/管×2	40 μL/管×1
	Ligation Buffer-V3	本色	160 μL/管×2	80 μL/管×1
	scRNA Adapter-V3	本色	40 μL/管×2	20 μL/管×1
	PCR Amp Enzyme	本色	600 μL/管×2	300 μL/管×1
	Barcode Primer-1~8	本色	八联排×2 组	/
DNBelab C 系列 单细胞文库制备样本标签试剂盒 S (货号: 940-001920-00,16RXN)	Barcode Primer-9~16	本色	八联排×2 组	/
	Barcode Primer-17~24	本色	八联排×2 组	/
	Barcode Primer-25~32	本色	八联排×2 组	/
	Barcode Primer-1~8	本色	/	八联排×1 组
DNBelab C 系列 单细胞文库制备样本标签试剂盒 S (货号: 940-001926-00,4RXN)	Barcode Primer-9~16	本色	/	八联排×1 组

 提示 提前取出 DNA Clean Beads，室温平衡至少 30 分钟，使用前应涡旋混匀。

8.2 片段化及末端修复

操作步骤如下：

1. 取出 Frag Enzyme-V3，轻弹颠倒混匀，瞬时离心后置于冰上待用。应注意 Frag Enzyme-V3 不可涡旋。
2. 按下表在冰上配制片段化及末端修复反应体系。

表 25 片段化及末端修复体系

加样顺序	组分	单个反应体积(μL)
1	NF Water	25
2	Frag Buffer-V3	5
3	cDNA 产物	10
4	Frag Enzyme-V3	10
总体积		50

-  提示
- cDNA 产物最大投入量为 800 ng；若 cDNA 产物浓度 >80 ng/μL，则按 800 ng 投入，后用 NF Water 补齐体系。
 - Frag Enzyme-V3 应最后加入至反应体系中。

3. 涡旋振荡至完全混匀，瞬时离心将反应体系收集至管底。
4. 当 PCR 仪降至 4 °C，将步骤 4 所述 PCR 管置于 PCR 仪。按照下表的条件进行反应。

表 26 片段化及末端修复反应条件（反应体系 50 μL）

温度	时间
70 °C (热盖)	On
4 °C	1 分钟
32 °C	10 分钟
65 °C	30 分钟
4 °C	Hold

8.3 接头连接

操作步骤如下：

1. 按照下表在冰上配制接头连接反应体系。

表 27 接头连接反应体系

组分	单个反应体积(μL)
Ligation Buffer-V3	20
DNA Ligase-V3	10
scRNA Adapter-V3	5
NF Water	15
总体积	50

-  提示
- 接头连接反应体系较粘稠，操作时请慢吸慢放，确保加液量正确。
 - 多次涡旋振荡接头连接反应体系，确保反应体系混合均匀。

- 用移液器缓慢吸取 50 μL 配制好的接头连接反应体系加入第 33 页“8.2 片段化及末端修复”步骤 4 的 PCR 管中，涡旋振荡至完全混匀，瞬时离心后将反应体系收集到管底。
- 将上一步骤所述的 PCR 管置于 PCR 仪上，按照下表中的条件进行反应。

-  提示 此步反应关闭热盖模式，若热盖温度高于 25 $^{\circ}\text{C}$ ，可打开 PCR 仪盖进行反应。

表 28 接头连接反应条件（反应体系 100 μL ）

温度	时间
热盖	Off
20 $^{\circ}\text{C}$	15 分钟
4 $^{\circ}\text{C}$	Hold

- 反应结束后，瞬时离心将反应体系收集至管底。

8.4 接头连接产物纯化及片段筛选

-  提示
- 提前取出 DNA Clean Beads，室温平衡至少 30 分钟，使用前应涡旋混匀。
 - 操作前请仔细阅读第 43 页“附录 1 关于 DNA Clean Beads 及纯化”。

操作步骤如下：

- 吸取 100 μL (1 \times) DNA Clean Beads 至第 34 页“8.4 接头连接产物纯化及片段筛选”步骤 4 的接头连接产物中，并用移液器轻轻吹吸至完全混匀，最后一次应确保将吸头中所有液体及磁珠都打入 PCR 管中。
- 室温孵育 5 分钟。
- 瞬时离心后，将 PCR 管置于磁力架上，静置 2~5 分钟，至液体澄清，弃掉上清。
- 保持 PCR 管在磁力架上，加入 200 μL 新鲜配制的 80%乙醇，漂洗磁珠及管壁，静置 30 秒，弃掉上清。

5. 重复上一步，尽量吸干管内液体，有少量残留在管壁时可瞬时离心，在磁力架上分离后，用小量程的移液器将管底液体吸干。
6. 保持 PCR 管在磁力架上，打开管盖，室温干燥，直至磁珠表面无反光、无开裂。
 提示 切勿过度干燥，防止磁珠开裂。
7. 将 PCR 管从磁力架上取下，加入 102 μL NF Water，并用移液器轻轻吹吸至完全混匀。
8. 室温下孵育 5 分钟。
9. 瞬时离心，将 PCR 管置于磁力架上，静置 2~5 分钟至液体澄清，将 100 μL 上清转移到新的 0.2 mL PCR 管中。
10. 吸取 55 μL (0.55 \times) DNA Clean Beads 至上一步骤的 PCR 管中，并用移液器轻轻吹吸至完全混匀，最后一次应确保将吸头中所有液体及磁珠都打入 PCR 管中。
11. 室温孵育 5 分钟。
12. 瞬时离心后，将 PCR 管置于磁力架上，静置 2~5 分钟，至液体澄清，用移液器小心吸取上清，并转移到新的 PCR 管中，注意不要吸附到磁珠。
 提示 此步保留上清，切勿丢弃上清。
13. 吸取 15 μL (0.15 \times) DNA Clean Beads 加到上一步 PCR 管的上清中，并用移液器轻轻吹吸至完全混匀。
14. 室温孵育 5 分钟。
15. 瞬时离心后，将 PCR 管置于磁力架上，静置 2~5 分钟，至液体澄清，弃掉上清。
16. 保持 PCR 管在磁力架上，加入 200 μL 新鲜配制的 80%乙醇，漂洗磁珠及管壁，静置 30 秒，弃掉上清。
17. 重复上一步，尽量吸干管内液体，有少量残留在管壁时可瞬时离心，在磁力架上分离后，用小量程的移液器将管底液体吸干。
18. 保持 PCR 管在磁力架上，打开管盖，室温放置，直至磁珠表面无反光、无开裂。
 提示 切勿过度干燥，防止磁珠开裂。
19. 将 PCR 管从磁力架上取下，加入 48 μL NF Water，并用移液器轻轻吹吸至完全混匀。
20. 室温下孵育 5 分钟。
21. 瞬时离心，将 PCR 管置于磁力架上，静置 2 ~ 5 分钟至液体澄清，将 46 μL 上清转移到新的 0.2 mL PCR 管中。
 停止点 连接产物纯化后可在 -25 $^{\circ}\text{C}$ ~ -15 $^{\circ}\text{C}$ 条件下保存 24 小时。

8.5 PCR 扩增

-  提示
- 操作前请仔细阅读第 44 页“附录 2 关于 Barcode Primer 使用”
 - 若将 cDNA 文库和 Oligo 文库进行 pooling 测序，应注意：
 - 两种文库添加的 Barcode Primer 须不一致，避免生信分析无法拆分。
 - 尽量确保两种文库添加的 Barcode Primer 各自组成碱基平衡 Barcode。

操作步骤如下：

- 按下表配制 PCR 扩增反应体系：

表 29 PCR 扩增反应体系

组分	单个反应体积(μL)
步骤 21 上清 (第 34 页 “8.4 接头连接产物纯化及片段筛选”)	46
Barcode Primer	4
PCR Amp Enzyme	50
总体积	100

- 将上一步骤中所述 PCR 管置于 PCR 仪上，按照下表的条件进行反应。

表 30 PCR 反应条件 (反应体系 100 μL)

温度	时间	循环数
105 $^{\circ}\text{C}$ (热盖)	On	/
95 $^{\circ}\text{C}$	3 分钟	1
98 $^{\circ}\text{C}$	20 秒	12
58 $^{\circ}\text{C}$	20 秒	
72 $^{\circ}\text{C}$	30 秒	
72 $^{\circ}\text{C}$	5 分钟	1
4 $^{\circ}\text{C}$	Hold	/

8.6 PCR 扩增产物筛选

-  提示
- 提前取出 DNA Clean Beads，室温平衡至少 30 分钟，使用前应涡旋混匀。
 - 操作前请仔细阅读第 43 页 “附录 1 关于 DNA Clean Beads 及纯化”。

操作步骤如下：

- 吸取 55 μL (0.55 \times) DNA Clean Beads 至 PCR 产物中，并用移液器轻轻吹吸至完全混匀，最后一次应确保将吸头中所有液体及磁珠都打入 PCR 管中。
- 室温孵育 5 分钟。
- 瞬时离心后，将 PCR 管置于磁力架上，静置 2~5 分钟，至液体澄清，用移液器小心吸取上清，并转移到新的 PCR 管中，注意不要吸附到磁珠。

-  提示 此步保留上清，切勿丢弃上清。

- 吸取 15 μL (0.15 \times) DNA Clean Beads 加到上一步 PCR 管的上清中，并用移液器轻轻吹吸至完全混匀。

5. 室温孵育 5 分钟。
6. 瞬时离心后，将 PCR 管置于磁力架上，静置 2~5 分钟，至液体澄清，弃掉上清。
7. 保持 PCR 管在磁力架上，加入 200 μL 新鲜配制的 80%乙醇，漂洗磁珠及管壁，静置 30 秒，弃掉上清。
8. 重复上一步，尽量吸干管内液体，有少量残留在管壁时可瞬时离心，在磁力架上分离后，用小量程的移液器将管底液体吸干。
9. 保持 PCR 管在磁力架上，打开管盖，室温放置，直至磁珠表面无反光、无开裂。

 提示 切勿过度干燥，防止磁珠开裂。

10. 将 PCR 管从磁力架上取下，加入 32 μL TE Buffer，并用移液器轻轻吹吸至完全混匀。
11. 室温下孵育 5 分钟。
12. 瞬时离心，将 PCR 管置于磁力架上，静置 2~5 分钟至液体澄清，将 30 μL 上清转移到新的 1.5 mL 离心管中，标记为 cDNA 文库。
13. 取 1 μL cDNA 文库使用 Qubit dsDNA HS Assay Kit 检测浓度。取适量片段筛选后的产物检测片段分布。
参考值：cDNA 文库浓度大于 10 ng/ μL ，片段分布在 350~550 bp 之间。

 提示 该参考值为使用标准人源 PBMC 测试所得。对于不同类型样本，文库浓度可能存在差异。

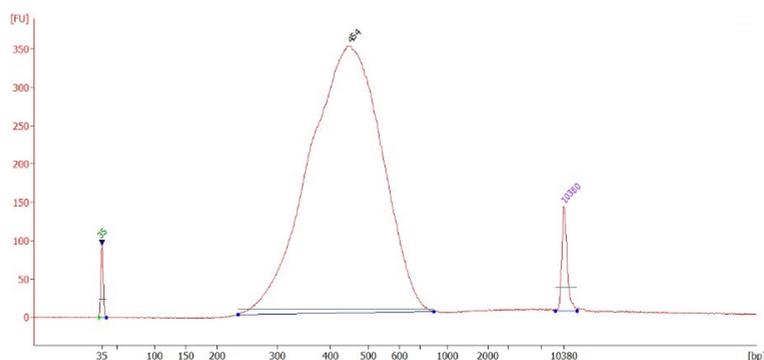


图 14 cDNA 文库片段分布图（使用 2100 片段分析仪检测参考图）

 停止点 cDNA 文库可在 -25 $^{\circ}\text{C}$ ~ -15 $^{\circ}\text{C}$ 条件下保存 6 个月。

8.7 环化文库构建（cDNA 文库和 Oligo 文库）

操作步骤如下：

1. 取出 MGIEasy 环化试剂盒进行环化文库的构建。

 提示 环化前请仔细阅读 MGIEasy 环化试剂盒使用说明书 (<https://www.mgi-tech.com/download/files/?q=1000005259>)，并严格按照说明书的内容进行操作。

2. 两种文库建议环化投入量如下表，若不足建议量，可将多样本 Pooling（建议最多 4 个文库）后进行环化或者重新建库。

表 31 环化文库制备要求

文库类型	环化投入量
cDNA 文库	400 ng
Oligo 文库	400 ng

第 9 章 测序

本章主要介绍文库适配的基因测序仪、测序试剂以及读长。

提示 MGI 的单细胞 scATAC 文库不能和 MGI 的 APP 系列转换接头试剂盒转化的文库进行同载片或者同 Lane pooling 测序。

9.1 文库结构

文库结构如下图所示：



图 15 cDNA 文库结构

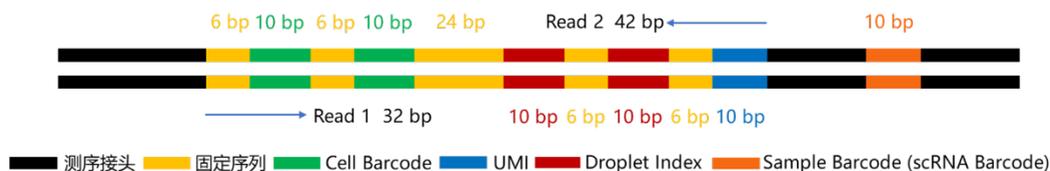


图 16 Oligo 文库结构

- 提示**
- 对于 cDNA 文库，测序读长：
Reads 1=30 bp（1 链固定序列 6+6+5=17 bp 暗反应），
Reads 2=100 bp。
 - 对于 Oligo 文库，测序读长：
Reads 1=20 bp（1 链固定序列 6+6=12 bp 暗反应），
Reads 2=30 bp（2 链固定序列 6+6=12 bp 暗反应）。

9.2 MGISEQ-2000RS 测序平台实验要求

9.2.1 实验前准备

 提示 测序前请仔细阅读 *MGISEQ-2000RS 高通量（快速）测序试剂套装使用说明书*，并严格按照说明书的内容进行操作。

种类	型号	货号
测序仪	MGISEQ-2000RS 测序仪	/
测序试剂套装	MGISEQ-2000RS 高通量测序试剂套装 (FCL PE100)	1000012554
	MGISEQ-2000RS 高通量测序试剂套装 (FCL PE150)	1000012555

9.2.2 DNB 制备

按下表制备 DNB：

 提示 如果需要 pooling 测序，建议先将不同样本 pooling 之后再制备 DNB。

表 32 MGISEQ-2000RS DNB 制备要求

测序试剂	PE100/PE150	
文库类型	cDNA 文库	Oligo 文库
Make DNB 投入量	10 ng	6 ng
RCA 时间	20 分钟	20 分钟

 提示 若 cDNA 环化文库不足 10 ng，可将 sscDNA 文库的投入量调整为 6 ng，RCA 时间调整为 26 分钟制备 DNB。

9.2.3 文库 Pooling

不同文库 Pooling 时，Barcode Primer 的 Pooling 规则参考第 44 页“附录 2 关于 Barcode Primer 使用”。

9.2.4 测序参数

表 33 MGISEQ-2000RS 测序软件版本及读长(混样, 测 Barcode)

	cDNA 文库				Oligo 文库			
软件版本	ECR 3.0	ECR 4.0	ECR 6.0	ECR7.0	ECR 3.0	ECR 4.0	ECR 6.0	ECR7.0
控制软件版本	Zebra V2Seq_1.4.0.184 及以上版本				Zebra V2Seq_1.4.0.184 及以上版本			
Basecall 版本	Basecall_1.0.8.208 及以上版本				Basecall_1.0.8.208 及以上版本			
测序脚本	C4_scRNA_BC_PE47+100+10	C4_scRNA_BC_PE47+100+10-ECR4.0	Z_C4_scRNA_BC-ECR6.0	自定义	C4_Oligo_BC_PE32+42+10	C4_Oligo_BC_PE32+42+10-ECR4.0	Z_C4_Oligo_BC-ECR6.0	自定义
Reads 1	47 cycles (1-6 bp, 17-22 bp, 33-37 bp 设置暗反应)				32 cycles (1-6 bp, 17-22 bp 设置暗反应)			
Reads 2	100 cycles				42 cycles (11-16 bp, 27-32 bp 设置暗反应)			
Sample Barcode	10 cycles				10 cycles			
测序深度	>50 k Reads/cell				> 50 M reads / library			

表 34 MGISEQ-2000RS 测序软件版本及读长(不混样, 不测 Barcode)

	cDNA 文库				Oligo 文库			
软件版本	ECR 3.0	ECR 4.0	ECR 6.0	ECR7.0	ECR 3.0	ECR 4.0	ECR 6.0	ECR7.0
控制软件版本	Zebra V2Seq_1.4.0.184 及以上版本				Zebra V2Seq_1.4.0.184 及以上版本			
Basecall 版本	Basecall_1.0.8.208 及以上版本				Basecall_1.0.8.208 及以上版本			
测序脚本	C4_scRNA_noBC_PE47+100	C4_scRNA_noBC_PE47+100-ECR4.0	Z_C4_scRNA_noBC-ECR6.0	自定义	C4_Oligo_noBC_PE32+42	C4_Oligo_noBC_PE32+42-ECR4.0	Z_C4_Oligo_noBC-ECR6.0	自定义
Reads 1	47 cycles (1-6 bp, 17-22 bp, 33-37 bp 设置暗反应)				32 cycles (1-6 bp, 17-22 bp 设置暗反应)			
Reads 2	100 cycles				42 cycles (11-16 bp, 27-32 bp 设置暗反应)			

	cDNA 文库	Oligo 文库
Sample Barcode	/	/
测序深度	>50 k Reads/cell	>50 M reads/library

9.3 DNBSEQ-T7RS 测序平台实验要求

9.3.1 实验前准备

 **提示** 测序前请仔细阅读 DNBSEQ-T7RS 高通量测序试剂套装使用说明书，并严格按照说明书的内容进行操作。

种类	型号	货号
测序仪	DNBSEQ-T7RS 测序仪	/
测序试剂套装	DNBSEQ-T7RS 高通量测序试剂套装 (FCL PE100) V3.0	940-000269-00
	DNBSEQ-T7RS 高通量测序试剂套装 (FCL PE150) V3.0	940-000268-00

9.3.2 DNB 制备

按下表制备 DNB:

表 35 DNBSEQ-T7RS DNB 制备要求

测序试剂	PE100		PE150	
	cDNA 文库	Oligo 文库	cDNA 文库	Oligo 文库
Make DNB 投入量	10 ng	6 ng	10 ng	6 ng
RCA 时间	20 分钟	20 分钟	10 分钟	10 分钟

9.3.3 文库 Pooling

不同文库 Pooling 时, Barcode Primer 的 Pooling 规则参考第 44 页“附录 2 关于 Barcode Primer 使用”。

9.3.4 测序参数

表 36 DNBSEQ-T7RS 测序软件版本及读长

	cDNA 文库	Oligo 文库
软件版本	ECR 4.0 及以上版本	ECR 4.0 及以上版本
控制软件版本	1.4.1.812 及以上版本	1.4.1.812 及以上版本
Basecall 版本	1.4.21.72_Ubuntu 及以上版本	1.4.21.72_Ubuntu 及以上版本
测序脚本	自定义	自定义
Custom Primers	No	No
Reads 1	47 cycles (1-6 bp, 17-22 bp, 33-37 bp 设置暗反应)	32 cycles (1-6 bp, 17-22 bp 设置暗反应)
Reads 2	100 cycles	42 cycles (11-16 bp, 27-32 bp 设置暗反应)
Sample Barcode	10 cycles	10 cycles
测序深度	>50 k Reads/cell	>50 M reads /library

附录 1 关于 DNA Clean Beads 及纯化

DNA Clean Beads 使用前注意事项

- DNA Clean Beads（以下简称“磁珠”）使用前，提前 30 分钟从 4 °C 的冰箱取出，涡旋混匀且平衡至室温，有利于保证回收效率。
- 磁珠每次使用前，需振荡或上下颠倒，确保充分混匀。
- 磁珠使用量直接影响纯化得到的 DNA 片段的下限长度。磁珠用量越高，纯化得到的 DNA 片段的下限长度越小。

DNA Clean Beads 操作注意事项

- 若待纯化的样本体积因温度孵育导致蒸发减少，应加入 TE Buffer 补齐体积，再用推荐磁珠用量纯化。
- 样本与磁珠充分混匀后置于磁力架上进行分离时，请于溶液彻底澄清后再吸取上清，一般需要 2~5 分钟。但由于磁力架磁性不同等原因，分离时间可能需要延长，以液体彻底澄清为准。
- 在分离磁珠与液体时，注意吸头不可碰到磁珠，最后可留 2~3 μL 液体，避免吸到磁珠。若不慎吸到磁珠，可将磁珠与液体全部打回管内，再次分离后吸取上清。
- 磁珠乙醇漂洗应使用新鲜配制并平衡至室温的 80% 乙醇。漂洗过程中离心管应始终置于磁力架上，移液器吸头应在远离磁力架的管壁上操作，请勿吹吸、搅动磁珠。
- 第二次乙醇漂洗应尽量吸干管底液体，有少量残留在管壁时可将离心管瞬时离心，在磁力架上分离后，用小量程的移液器把管底液体吸干。
- 两次乙醇漂洗后，应在室温下充分干燥磁珠。干燥不充分（磁珠表面反光）容易造成无水乙醇残留影响后续反应，过分干燥（磁珠开裂）会降低纯化得率。通常情况下，室温干燥需要 5~10 分钟，但由于室内温度和湿度的差异，干燥时间可能会不同，应随时观察，磁珠表面无反光，即可进行产物洗脱。
- 洗脱后吸取上清时，切忌触碰磁珠，若吸到磁珠可能会影响后续的纯化反应，所以洗脱体积应该比最终吸取上清的体积多 2 μL 。
- 在 1.5 mL 磁力架上开关管盖应小心，避免剧烈震动导致磁珠或液体弹出，建议用手指固定住 1.5 mL 离心管中下段，然后开盖。

附录 2 关于 Barcode Primer 使用

本试剂套装根据反应规格不同，分别提供 16 种或者 32 种 Barcode Primer 【DNBelab C 系列 单细胞文库制备样本标签试剂盒 S】（货号：940-001920-00，32 种；货号：940-001926-00，16 种）。套装中的 Barcode Primer 是基于碱基平衡的设计原则，经过反复实验测试，挑选出 Barcode 组合。为保证效果，使用时请仔细阅读此附录。



- 提示
- 请勿将其置于室温以上的温度，否则易发生解链，影响使用效果。
 - Barcode Primer 使用前必须先混匀并离心，用吸水纸擦拭干净管盖，使用时需轻柔地打开管盖，防止液体飞溅，避免交叉污染，使用完毕后及时盖上管盖。

B-1 Barcode Primer 使用规则：

基于碱基平衡的设计原则，需将 Barcode Primer 成组使用或单个使用，其中：

- 第一组：Barcode Primer-1~4 为 1 组碱基平衡 Barcode；
- 第二组：Barcode Primer-5~8 为 1 组碱基平衡 Barcode；
- 第三组：Barcode Primer-9~12 为 1 组碱基平衡 Barcode；
- 第四组：Barcode Primer-13~16 为 1 组碱基平衡 Barcode；
- 第五组：Barcode Primer-17~24 为 1 组碱基平衡 Barcode；
- 第六组：Barcode Primer-25~32 为 1 组碱基平衡 Barcode。

以上共 6 组，当每个样本数据量要求相同时，不同样本数目请参考下表的推荐 Barcode Primer 组合方案。

表 37 Barcode Primer 使用规则

样本数/ lane	方法 1	方法 2	方法 3	方法 4	方法 5	方法 6
1	1~4	5~8	9~12	13~16	/	/
2	样本 1: 1~2 样本 2: 3~4	样本 1: 5~6 样本 2: 7~8	样本 1: 9~10 样本 2: 11~12	样本 1: 13~14 样本 2: 15~16	样本 1: 17~20 样本 2: 21~24	样本 1: 25~28 样本 2: 29~32
3	样本 1: 1 样本 2: 2 样本 3: 3~4	样本 1: 5 样本 2: 6 样本 3: 7~8	样本 1: 9 样本 2: 10 样本 3: 11~12	样本 1: 13 样本 2: 14 样本 3: 15~16	样本 1: 17~18 样本 2: 19~20 样本 3: 21~24	样本 1: 25~26 样本 2: 27~28 样本 3: 29~32
4	样本 1: 1 样本 2: 2 样本 3: 3 样本 4: 4	样本 1: 5 样本 2: 6 样本 3: 7 样本 4: 8	样本 1: 9 样本 2: 10 样本 3: 11 样本 4: 12	样本 1: 13 样本 2: 14 样本 3: 15 样本 4: 16	样本 1: 17~18 样本 2: 19~20 样本 3: 21~22 样本 4: 23~24	样本 1: 25~26 样本 2: 27~28 样本 3: 29~30 样本 4: 31~32

样本数/ lane	方法 1	方法 2	方法 3	方法 4	方法 5	方法 6
5	样本 1: 1 样本 2: 2 样本 3: 3 样本 4: 4 样本 5: 任选 其余 3 组中 1 组	样本 1: 5 样本 2: 6 样本 3: 7 样本 4: 8 样本 5: 任选 其余 3 组中 1 组	样本 1: 9 样本 2: 10 样本 3: 11 样本 4: 12 样本 5: 任选 其余 3 组中 1 组	样本 1: 13 样本 2: 14 样本 3: 15 样本 4: 16 样本 5: 任选 其余 3 组中 1 组	样本 1: 17 样本 2: 18 样本 3: 19 样本 4: 20 样本 5: 21~24	样本 1: 25 样本 2: 26 样本 3: 27 样本 4: 28 样本 5: 29~32
6	样本 1: 1 样本 2: 2 样本 3: 3 样本 4: 4 样本 5 和样本 6: 任选其余 3 组中 2 组	样本 1: 5 样本 2: 6 样本 3: 7 样本 4: 8 样本 5 和样本 6: 任选其余 3 组中 2 组	样本 1: 9 样本 2: 10 样本 3: 11 样本 4: 12 样本 5 和样本 6: 任选其余 3 组中 2 组	样本 1: 13 样本 2: 14 样本 3: 15 样本 4: 16 样本 5 和样本 6: 任选其余 3 组中 2 组	样本 1: 17 样本 2: 18 样本 3: 19 样本 4: 20 样本 5: 21~22 样本 6: 23~24	样本 1: 25 样本 2: 26 样本 3: 27 样本 4: 28 样本 5: 29~30 样本 6: 31~32
7	样本 1: 1 样本 2: 2 样本 3: 3 样本 4: 4 样本 5~7: 参 照 3 样本/lane 选择组合	样本 1: 5 样本 2: 6 样本 3: 7 样本 4: 8 样本 5~7: 参 照 3 样本/lane 选择组合	样本 1: 9 样本 2: 10 样本 3: 11 样本 4: 12 样本 5~7: 参 照 3 样本/lane 选择组合	样本 1: 13 样本 2: 14 样本 3: 15 样本 4: 16 样本 5~7: 参 照 3 样本/ lane 选择组合	样本 1: 17 样本 2: 18 样本 3: 19 样本 4: 20 样本 5: 21 样本 6: 22 样本 7: 23~24	样本 1: 25 样本 2: 26 样本 3: 27 样本 4: 28 样本 5: 29 样本 6: 30 样本 7: 31~32
8	4 组 Barcode Primer 任选 2 组		17~24		25~32	
8+x (x=1~8, 总计 9 ~ 16 个)	分两步操作: 1. 样本 1~8 分成 1 组, 采用上述 (8 样本数/lane) 方法加 Barcode Primer。 2. 剩余样本分成 1 组, 根据 X 的数值, 采用上述对应的 1~8 样本数/lane 方法加 Barcode Primer, 并注意按照对应要求加不同组别的 Barcode Primer。					



提示

- 需添加混合 Barcode Primer 的样本, N 个 Barcode Primer 之间要等体积混合后再加入样本中。
- Barcode Primer (1~16) 是 4 个为一组碱基平衡 Barcode, 其中 1~4 为一组, 5~8 为一组, 以此类推; Barcode Primer (17~32) 是 8 个为一组碱基平衡 Barcode, 其中 17~24 为一组, 25~32 为一组。

附录 3 制造商信息

生产企业名称	青岛华大智造科技有限责任公司
生产地址	中国（山东）自由贸易试验区青岛片区横云山路 2 号 4 号楼
技术支持电话	4000-688-114
技术支持邮箱	MGI-service@mgi-tech.com
网址	www.mgi-tech.com

编号：H-020-000898-00

创新智造 引领生命科技

生产地址：中国（山东）自由贸易试验区青岛片区横云山路 2 号 4 号楼

电 话：4000-688-114

邮 箱：MGI-service@mgi-tech.com

网 址：www.mgi-tech.com