

SeekOne® DD 单细胞 ATAC+RNA 双组学试剂盒

操作说明书

V1.0

REF: K02901-02 (2 tests)

K00202-0201

K00801-0202

K02901-0201

K02901-0202

K02901-0203

K00202-0204

K00202-0205

REF: K02901-08 (8 tests)

K00202-0801

K00801-0802

K02901-0801

K02901-0802

K02901-0803

K00202-0804

K00202-0805

Envision the Future

预见未来

北京寻因生物科技有限公司

目 录

1 产品介绍.....	3
1.1 产品简介.....	3
1.2 预期用途.....	3
1.3 使用者要求.....	3
1.4 检测方法的局限性.....	3
1.5 样本要求.....	4
1.6 产品原理.....	4
1.7 产品试剂组分.....	5
1.8 保存以及运输条件.....	9
1.9 参数说明.....	10
1.10 配套使用的仪器和耗材.....	10
1.11 需自备的仪器和试剂.....	11
1.11.1 自备仪器及耗材.....	11
1.11.2 自备试剂/试剂盒.....	11
2 实验操作步骤.....	12
Step 1 单细胞核内基因组片段化.....	14
Step 1-1 实验前准备.....	14
Step 1-2 核内基因组片段化反应.....	14
Step 2 油包水生成及 Barcode 标记.....	14
Step 2-1 实验前准备.....	15
Step 2-2 准备单细胞核反应混合液（冰上操作）.....	15
Step 2-3 向 Chip S3 加入试剂.....	16
Step 2-4 运行 SeekOne® DD.....	17
Step 2-5 转移生成的油包水.....	19
Step 2-6 油包水反应.....	20
Step 3 破乳和纯化.....	20
Step 3-1 实验前准备.....	20
Step 3-2 油包水破乳.....	20

Step 4 ATAC 片段和 cDNA 的预扩增与纯化	22
Step 4-1 实验前准备	22
Step 4-2 预扩增	22
Step 4-3 预扩增产物纯化	22
Step 5 ATAC 文库扩增与纯化.....	24
Step 5-1 实验前准备	24
Step 5-2 ATAC 片段富集	24
Step 5-3 ATAC 富集产物分选纯化	24
Step 5-4 ATAC 文库扩增	25
Step 5-5 ATAC 文库扩增产物纯化	26
Step 5-6 ATAC 文库质检	26
Step 6 转录组文库构建.....	29
Step 6-1 实验前准备	29
Step 6-2 cDNA 富集.....	29
Step 6-3 cDNA 富集产物纯化.....	29
Step 6-4 cDNA 富集产物质检.....	30
Step 6-5 DNA 片段化与末端修复.....	31
Step 6-6 接头连接	31
Step 6-7 连接产物纯化	32
Step 6-8 转录组文库扩增	32
Step 6-9 转录组文库纯化	33
Step 6-10 转录组文库质控标准	33
附录 1 高通量测序.....	35
附录 2 生物信息学分析.....	37
附录 3 SeekOne® 数字液滴仪使用说明	38
附录 4 SeekOne® 数字液滴仪故障处理	38
附录 5 包装符号释义.....	40
附录 6 修订历史.....	40

1 产品介绍

1.1 产品简介

SeekOne® DD 单细胞 ATAC+RNA 双组学检测技术是由北京寻因生物科技有限公司自主研发的一项创新型单细胞表观遗传研究技术。该技术基于微流控原理，结合自主研发的条形码凝胶微珠（Barcoded Beads）和油包水（Water-in-Oil）体系，通过构建共享单细胞标签的转录组和 ATAC 文库，可实现高通量单细胞 RNA 和染色质可及区共检测。该技术能够在单细胞分辨率下同时绘制基因表达图谱和染色质开放区域图谱，为深入研究细胞异质性、基因调控网络及表观遗传机制提供了多维度的数据支持。该技术同时配备分析软件 SeekArc Tools 及云平台 SeekSoul Online，为您提供一站式单细胞 ATAC 和转录组双组学分析方案。

1.2 预期用途

本产品旨在用于单细胞水平的基因表达谱和染色质可及性的整合分析。可广泛应用于肿瘤微环境中细胞间相互作用机制解析、细胞发育轨迹追踪以及疾病发生发展机制等研究领域，为单细胞多组学研究提供全面、精准的技术支持。

1.3 使用者要求

本试剂盒的操作人员需具备以下条件：

- ① **专业背景：**操作人员应为分子生物学专业人员，具备扎实的分子生物学实验操作技能。
- ② **培训与资质：**操作人员需经过相关培训并通过考核，确保熟练掌握试剂盒的操作流程和注意事项，方可独立进行操作。
- ③ **安全与规范：**操作过程中需严格遵守实验室安全规范及试剂盒使用说明，以确保实验结果的准确性和操作的安全性。

通过以上要求，确保试剂盒在专业、规范的操作环境下使用，保障实验数据的可靠性和可重复性。

1.4 检测方法的局限性

本试剂盒仅用于科研实验，不用于诊断或治疗。

1.5 样本要求

①. 样本类型要求

本试剂盒适用于从新鲜组织解离后提取的单细胞核样本、冰冻组织直接提取的单细胞核样本、新鲜培养细胞提取的单细胞核样本或冻存细胞提取的单细胞核样本。

不能出现大颗粒沉淀物，如有大颗粒沉淀物需用 40 μm 细胞过滤器过滤；

细胞核直径：5 - 40 μm 。

②. 样本质量要求

细胞核数量：建议 >10 万，最低不少于 5 千；

细胞核完整性：核膜形态完整，细胞核 AO/PI 荧光染色活率 <5%；

结团率 <15%，有核率 >60%。

③. 样本储存要求

细胞核悬液制备完成后冰上放置，30 min 内开始染色质可及区片段化实验效果最佳。

④. 上样量建议

油包水细胞核上样量不高于 1.5 万。

1.6 产品原理

实验流程中，首先通过 Tn5 转座酶将单细胞核悬液中的染色质开放区片段化，随后基于具有细胞标签的凝胶微珠，利用油包水技术在不同液滴内对来源于不同细胞核的 RNA 和片段化的染色质可及区分别进行核酸标记。最终，构建兼容真迈和 Illumina 测序平台的高通量单细胞转录组文库和单细胞 ATAC 文库。

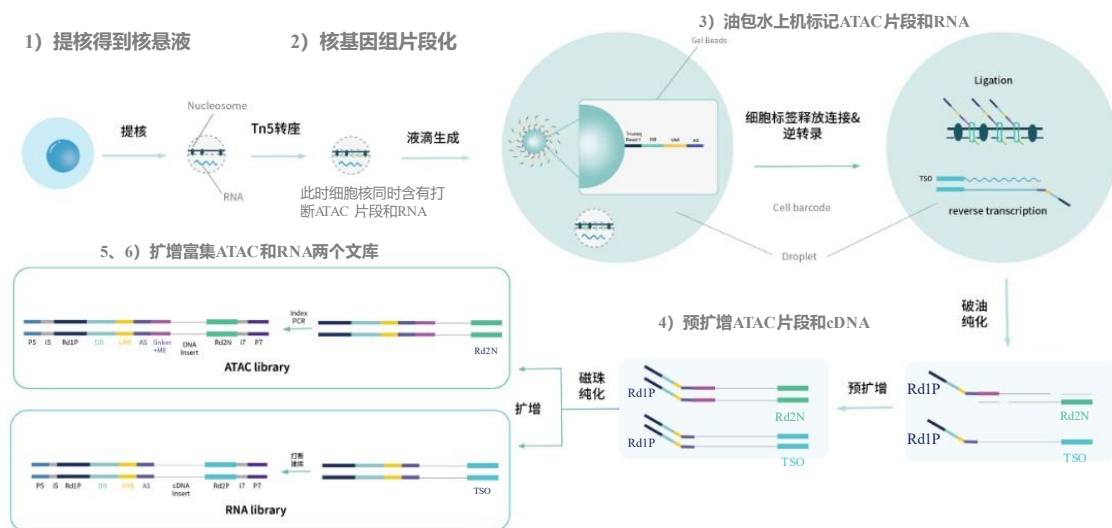


图 1.1 SeekOne® DD 单细胞 ATAC+RNA 双组学原理示意图

实验步骤:

- (1) 细胞核悬液制备: 组织解离成细胞悬液抽核或组织直接抽核;
- (2) 染色质可及区片段化: 通过 Tn5 转座酶进行基因组片段化;
- (3) 油包水生成: 通过 Barcode Beads 标记同一细胞核内的 ATAC 片段和 RNA, RNA 基于半随机引物逆转录标记, ATAC 序列基于连接策略标记;
- (4) 预扩增: 对标记产物 (RNA 和 ATAC 片段) 进行富集;
- (5) ATAC 文库构建: ATAC 文库基于 Truseq Read1 SeqPrimer × Nextera Read2 SeqPrimer 进行扩增建库;
- (6) RNA 文库构建: RNA 文库基于 Truseq Read1 SeqPrimer 和模板转换引物扩增后打断建库;
- (7) 文库质检及测序。

1.7 产品试剂组分

SeekOne® DD 单细胞 ATAC+RNA 双组学产品包含 7 个试剂子盒, 使用前请核对子盒名称和数量信息, 子盒信息见表 1.1; 子盒各组分信息见表 1.2 和表 1.3。

表 1.1 SeekOne® DD 单细胞 ATAC+RNA 双组学产品试剂盒子盒组成

序号	子盒名称
1	SeekOne® DD S3 芯片试剂盒
2	SeekOne® DD 单细胞基因组片段化试剂盒
3	SeekOne® DD 单细胞全序列微珠试剂盒
4	SeekOne® DD 单细胞 ATAC+RNA 双组学油包水试剂盒
5	SeekOne® DD 单细胞纯化试剂盒
6	SeekOne® DD 单细胞 ATAC+RNA 双组学扩增试剂盒
7	SeekOne® DD 文库构建试剂盒

表 1.2 SeekOne® DD 单细胞 ATAC+RNA 双组学试剂盒, 2 tests, REF: K02901-02

名称	数量	管盖颜色	组分	CN	2 tests/袋
SeekOne® DD S3 芯片试剂盒 V1.0 K00202-0201	1	-	SeekOne® DD Chip S3	R0003001	2 张
		-	Gasket	R0003101	2 张
		●	Carrier Oil	R0003201	0.6 mL
		●	Demulsion Agent	R0003301	0.5 mL
SeekOne® DD 单细胞基因组片段化试剂盒 V1.0 K02901-0201	1	●	Tn5-BM	R0016602	20 uL
		●	RNase Inhibitor-B	R0015501	12 uL
		●	Reaction Buffer	R0017601	400 uL
		●	Buffer S	R0012501	0.5 mL
SeekOne® DD 单细胞全序列微珠试剂盒 V1.2 K00801-0202	1	○	Single Cell Whole Transcriptome Barcoded Beads	R0008601	45 uL ×2 管
		○	TSO	R0003601	10 uL
SeekOne® DD 单细胞 ATAC+RNA 双组学油包水试剂盒 V1.0 K02901-0202	1	●	ATAC Enzyme T	R0017801	25 uL
		●	Reducing Buffer	R0003901	100 uL
		●	RB Primers	R0017901	10 uL
		●	3×RT Buffer	R0008401	80 uL
		●	Buffer PB	R0018001	100 uL
SeekOne® DD 单细胞 ATAC+RNA 双组学扩增试剂盒 V1.0 K02901-0203	1	●	2×PCR Master Mix	R0002102	240 uL
		●	cDNA Primers	R0004002	20 uL
		●	ATAC-Primer	R0018101	10 uL
		●	Blockers-HM	R0008501	10 uL
		●	M4-ATAC-Primers	R0018201	10 uL
		●	A701	R0018301	25 uL
		●	A702	R0018401	25 uL
SeekOne® DD 文库构建试剂盒 V1.0 K00202-0204	1	●	Fragmentation Buffer	R0004101	15 uL
		●	Fragmentation Enzyme	R0004201	24 uL
		●	Ligation Buffer	R0004301	60 uL
		●	DNA Ligase	R0004401	15 uL
		●	Adaptor	R0004501	15 uL
		●	2×PCR Master Mix	R0002101	60 uL
		●	N501	R0004601	25 uL
		●	N502	R0004701	25 uL
		●	N701	R0005001	25 uL
		●	N702	R0005101	25 uL
SeekOne® DD 单细胞纯化试剂盒 V1.0 K00202-0205	1	○	Cleanup Beads	R0003401	0.5 mL

表 1.3 SeekOne® DD 单细胞 ATAC+RNA 双组学试剂盒，8 tests，REF: K02901-08

名称	数量	管盖颜色	组分	CN	8 tests/盒
SeekOne® DD S3 芯片试剂盒 V1.0 K00202-0801	1	-	SeekOne® DD Chip	R0003001	8 张
		-	S3		
		-	Gasket	R0003101	8 张
		●	Carrier Oil	R0003202	1.2 mL×2 管
		●	Demulsion Agent	R0003302	1.8 mL
SeekOne® DD 单细胞基因组片段化试剂盒 V1.0 K02901-0801	1	●	Tn5-BM	R0016603	60 uL
		●	RNase Inhibitor-B	R0015501	12 µL×2 管
		●	Reaction Buffer	R0017602	1.5 mL
		●	Buffer S	R0012501	0.5 mL
SeekOne® DD 单细胞全序列微珠试剂盒 V1.2 K00801-0802	1	○	Single Cell Whole		
		○	Transcriptome	R0008601	45 µL ×8 管
		○	Barcoded Beads		
SeekOne® DD 单细胞 ATAC+RNA 双组学油包水试剂盒 V1.0 K02901-0802	1	○	TSO	R0003602	20 µL
		●	ATAC Enzyme T	R0017802	90 µL
		●	Reducing Buffer	R0003901	100 µL
		●	RB Primers	R0017902	15 µL
		●	3×RT Buffer	R0008402	280 µL
SeekOne® DD 单细胞 ATAC+RNA 双组学扩增试剂盒 V1.0 K02901-0803	1	●	Buffer PB	R0018002	300 µL
		●	2×PCR Master Mix	R0002102	240 µL×4 管
		●	cDNA Primers	R0004003	40 µL
		●	ATAC-Primer	R0018101	10 uL
		●	Blockers-HM	R0008502	30 µL
		●	M4-ATAC-Primers	R0018202	20 µL
		●	A701	R0018301	25 µL
		●	A702	R0018401	25 µL
		●	A703	R0018501	25 µL
		●	A704	R0018601	25 µL

续表 1.3 SeekOne® DD 单细胞 ATAC+RNA 双组学试剂盒, 8 tests, REF: K02901-08

名称	数量	管盖颜色	组分	CN	8 tests/盒
SeekOne® DD 文库构建试剂盒 V1.0 K00202-0804	1		Fragmentation Buffer	R0004102	50 μL
			Fragmentation Enzyme	R0004202	100 μL
			Ligation Buffer	R0004302	240 μL
			DNA Ligase	R0004402	50 μL
			Adaptor	R0004502	50 μL
			2×PCR Master Mix	R0002102	240 μL
			N501	R0004601	25 μL
			N502	R0004701	25 μL
			N503	R0004801	25 μL
			N504	R0004901	25 μL
			N701	R0005001	25 μL
			N702	R0005101	25 μL
SeekOne® DD 单细胞纯化试剂盒 V1.0 K00202-0805	1		N703	R0005201	25 μL
			N704	R0005301	25 μL
				Cleanup Beads	R0003402

1.8 保存以及运输条件

试剂盒名称	数量	保存条件	运输条件
SeekOne® DD S3 芯片试剂盒	1	室温保存	常温运输
SeekOne® DD 单细胞纯化试剂盒	1	2~8℃保存	
SeekOne® DD 单细胞基因组片段化试剂盒	1	-20℃保存	干冰运输
SeekOne® DD 单细胞 ATAC+RNA 双组学油包水试剂盒	1		
SeekOne® DD 单细胞 ATAC+RNA 双组学扩增试剂盒	1		
SeekOne® DD 文库构建试剂盒	1		
SeekOne® DD 单细胞全序列微珠试剂盒	1	-80℃保存	

Index 序列信息

Index 号	正向序列
● A701	TAAGGCGA
● A702	CGTACTAG
● A703	AGGCAGAA
● A704	TCCTGAGC
● N501	ACTAGAGC
● N502	TGCCTATA
● N503	GCAGCTGT
● N504	ACGTTAAG
● N701	TCAAGTAT
● N702	CACTTCGA
● N703	GCCAAGAC
● N704	AAACATCG

注 1：Index 正向序列是指与 Illumina 官方提供的序列方向相一致，如果是在 HiSeq XTen 平台上测序，N5 Index 需提供反向互补序列；

注 2：本试剂盒提供的 Index 序列可最多同时标记 16 个样品；

注 3：文库的接头序列如下：

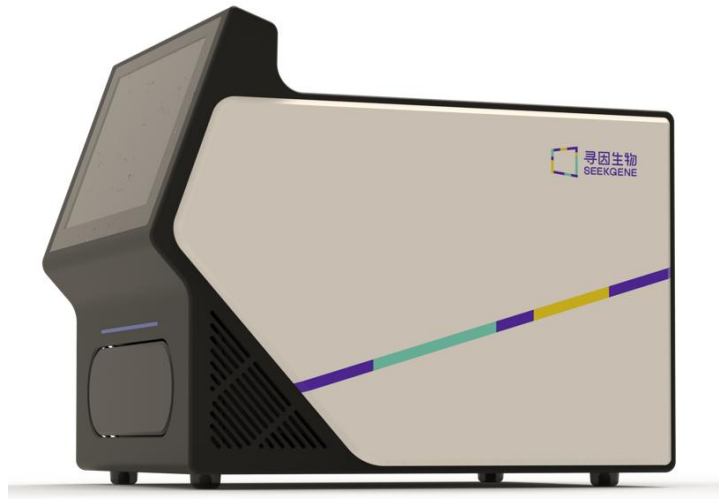
N5	5' AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC[N5]ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT 3'
N7	5' GATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCAC[N7]ATCTCGTATGCCGTCTTCTGCTTG 3'
A7	5' CTGTCTCTTATACATCTCCGAGCCCACGAGAC[A7]ATCTCGTATGCCGTCTTCTGCTTG 3'

1.9 参数说明

1. **样本通量**：Chip S3 是单通道芯片，根据需要单次可灵活运行 1-8 个样品；
2. **细胞捕获范围**：单通道可捕获 500-12,000 个细胞；
3. **油包水速率**：3 min 生成 15 万个油包水液滴；
4. **双胞胎率**：1,000 个细胞约 0.3%。

1.10 配套使用的仪器和耗材

1. SeekOne® 数字液滴仪（SeekOne® Digital Droplet System）。



2. SeekOne® DD 配件（SeekOne® DD Accessories）：每台仪器配套 1 套该配件，包括以下两个部分：

1) SeekOne® DD 芯片夹具（SeekOne® DD Chip Holder，简称 Chip Holder）：与 SeekOne® 数字液滴仪及 Chip S3 配套使用；

2) 占位芯片（Placed Chip，简称 Chip P）：放置于芯片夹具中（每台仪器附带 8 张 Chip P）；样本量不足 8 个时，Chip P 置于未添加样品孔位。



1.11 需自备的仪器和试剂

1.11.1 自备仪器及耗材

自备仪器以及耗材名称	推荐品牌及货号
细胞计数设备	Countstar, IN030101 或 北京寻因生物, M002C
0.2 mL 24 孔磁力架	Mich Scientific, Magpow-24-0.2
移液器	Eppendorf /RAININ (2.5 μ L/10 μ L/20 μ L/200 μ L/1,000 μ L)
核酸片段分析仪	Agilent, G2991AA (Agilent 4200 TapeStation 系统) 或 Bioptic, Qsep400 (Qsep400)
PCR 仪	Thermo Fisher Scientific, 4375786 或 Long Gene, A300 深模 或 BioRad, 1851196 (C1000)
0.2 mL PCR 管	Axygen, PCR-02-L-C
0.2 mL 八连排 PCR 管	Axygen, PCR-0208-FCP-C
Qubit 4.0	Thermo Fisher Scientific, Q33238
50 mL 离心管	Corning, 430829
微型离心机	天根生化, OSE-MP25
振荡仪	IKA (MS3 basic 圆周震荡器及附件)
DNase/RNase-free 低吸附 EP 管	Axygen, MCT-150-L-C
低吸附滤芯枪头	Axygen, T-300-L-R-S/ T-200-C-L-R-S/ T-1000-C-L-R-S

1.11.2 自备试剂/试剂盒

试剂名称	推荐品牌及货号
1×PBS	HyClone, SH30256.LS
无水乙醇 (分析纯)	Millipore Sigma, E7023-500ML
Nuclease-free Water	Thermo Fisher Scientific, AM9937
DNA 分选磁珠	Beckman Coulter, B23318 或 A63882 诺唯赞, N411-03
Qubit dsDNA HS Assay Kit	Thermo Fisher Scientific, Q32854
Agilent 4200 TapeStation 系统配套试剂	Agilent
D1000 ScreenTape/Reagents	5067-5582/ 5067-5583
High Sensitivity D5000 ScreenTape/Reagents	5067-5592/ 5067-5593
Bioptic Qsep 400 配套试剂	Bioptic
High Resolution Cartridge Kit	C405102
Standard Cartridge Kit	C405101

2 实验操作步骤

总用时	操作步骤	分步用时
Step 1 单细胞核内基因组片段化		
~ 45 min	Step 1-1 实验前准备	~15 min
	Step 1-2 核内基因组片段化反应	~30 min
	 Step1 完成后立即进行下一步;	
Step 2 油包水生成及 Barcode 标记		
~ 2.5 h	Step 2-1 实验前准备	~30 min
	Step 2-2 准备单细胞混合液（冰上操作）	~10 min
	Step 2-3 向 Chip S3 加入试剂	~10 min
	Step 2-4 运行 SeekOne® DD	~4.5 min
	Step 2-5 转移生成的油包水	~5 min
	Step 2-6 油包水反应	~90 min
	 Step2 完成后立即进行下一步;	
Step 3 破乳和纯化		
~1 h	Step 3-1 实验前准备	~30 min
	Step 3-2 油包水破乳	~5 min
	Step 3-3 纯化	~30 min
 停止点：油包水破乳后（Step 3-2 ）可-80℃保存1 周;		
Step 4 ATAC 片段和 cDNA 的预扩增与纯化		
~1.5 h	Step 4-1 实验前准备	~20 min
	Step 4-2 预扩增	~40 min
	Step 4-3 预扩增产物纯化	~30 min
	 停止点:	
1. 预扩增产物（Step 4-2 ）可4 度过夜;		
2. 预扩增产物纯化后（Step 4-3 ）可4℃保存72 h 或-20℃保存一个月;		
Step 5 ATAC 文库扩增与纯化		
~2.8 h	Step 5-1 实验前准备	~20 min
	Step 5-2 ATAC 片段富集	~40 min
	Step 5-3 ATAC 富集产物分选纯化	~40 min
	Step 5-4 ATAC 文库扩增	~30 min
	Step 5-5 ATAC 文库扩增产物纯化	~30 min
	Step 5-6 ATAC 文库质检	~10 min
 停止点:		
1. ATAC 片段富集(Step5-2)可4℃保存过夜;		
2. ATAC 富集产物分选纯化(Step5-3)可在4℃保存72h 或-20℃保存一个月;		

总用时	操作步骤	分步用时
	3. ATAC 文库扩增产物(Step5-4) 可在 4℃ 保存 72h 或-20℃ 保存一周;	
	4. ATAC 文库扩增产物纯化(Step5-5) 可在-20℃ 保存不超过 6 个月	

总用时	操作步骤	分步用时
Step 6 转录组文库扩增与纯化		
~4.4 h	Step 6-1 实验前准备	~20 min
	Step 6-2 cDNA 富集	~40 min
	Step 6-3 cDNA 富集产物纯化	~30 min
	Step 6-4 cDNA 富集产物质检	~10 min
	Step 6-5 DNA 片段化与末端修复	~40 min
	Step 6-6 连接产物纯化	~20 min
	Step 6-7 接头连接	~30 min
	Step 6-8 转录组文库扩增	~30 min
	Step 6-9 转录组文库纯化	~30 min
	Step 6-10 转录组文库质控标准	~10 min
STOP 停止点: - cDNA 富集 (Step 6-2) 和转录组文库扩增 (Step 6-8) 可在 4℃ 保存 72 h 或-20℃ 保存一周; - cDNA 富集产物纯化 (Step 6-3) 后可在 4℃ 保存 72 h 或-20℃ 保存一个月; - 转录组文库纯化的产物 (Step 6-9) 可在-20℃ 保存不超过 6 个月		

注：停止点均基于对应步骤完成后方可停止。

Step 1 单细胞核内基因组片段化

Step 1-1 实验前准备

- 提前准备好冰盒；
- 提前将 Reaction Buffer 从-20℃取出冰上解冻，充分振荡后瞬时离心，于冰盒上备用；
- Tn5-BM 使用前从-20℃取出，吹打混匀瞬时离心后立即使用；
- 细胞核需使用 1x Reaction Buffer 重悬。⚠

Step 1-2 核内基因组片段化反应

按照下表配 1x Reaction Buffer

组分	1x Reaction Buffer
● Reaction Buffer	100 uL
Nuclease-free Water	400 μL
Total	500 μL

注 1: 1x Reaction Buffer 可等比例按需所配，未用完可放于-20℃，保存效期 6 个月

1. 片段化试剂准备（冰上操作）

确定细胞核投入量，计算细胞核上样体积，根据下表依次加入对应试剂，轻柔吹打混匀 10 次，避免产生气泡，不可离心。

组分	体积
● Reaction Buffer	1 μL
● RNase Inhibitor-B	0.5 μL
Nuclease-free Water	1.5 μL
1x Reaction Buffer	10-X μL
细胞核≤1.5 万	X μL
● Tn5-BM	2 μL
Total	15 μL

注 1: Tn5-BM 粘滞度较高，取液时枪头不宜插入液面过深，缓慢吸取，避免挂壁导致的试剂不足。

注 2: 本产品细胞捕获率 60%±15%；

2. PCR 仪运行以下程序，热盖 50℃，体积 15uL:

温度	时间
37℃	30 min
4℃	Hold

3. 反应结束后立即进行下一步。⚠

Step 2 油包水生成及 Barcode 标记

Step 2-1 实验前准备

- 提前准备好冰盒；
 - 提前将 3×RT Buffer、Reducing Buffer、RB Primers 和 Buffer PB 从-20℃取出解冻，充分振荡后瞬时离心，置于冰盒上备用；
 - ATAC Enzyme T 使用前从-20℃取出，瞬时离心后立即使用；
 - 提前从-80℃取出 TSO 冰上解冻，充分振荡后瞬时离心，置于冰盒上备用。
 - 提前从-80℃冰箱取出**全序列 Barcoded Beads**，室温平衡 30 min 备用；
 - 确保 SeekOne® 数字液滴仪水平放置，运行在室温，无震动碰撞；
 - 开启 SeekOne® 数字液滴仪，放置占位芯片，运行自检程序，自检成功等待后续实验使用；
- 注：提前预备的 Barcoded Beads 如果中途实验取消不进行上机，待 Barcoded Beads 平衡至 30 min 彻底融化再收回-80℃冰箱，短时间内的冻融容易导致 Barcoded Beads 密度和粘稠度改变。

Step 2-2 准备单细胞核反应混合液（冰上操作）

1. 按照下表冰上配制反应 Mix，吹打 15 次混匀，瞬时离心；

组分	体积/样本
● 3×RT Buffer	26.6 μL
● ATAC Enzyme T	8.4 μL
● RB Primers	1.2 μL
○ TSO	2 μL
● Reducing Buffer	1.6 μL
● Buffer PB	25.2 μL
Total	65 μL

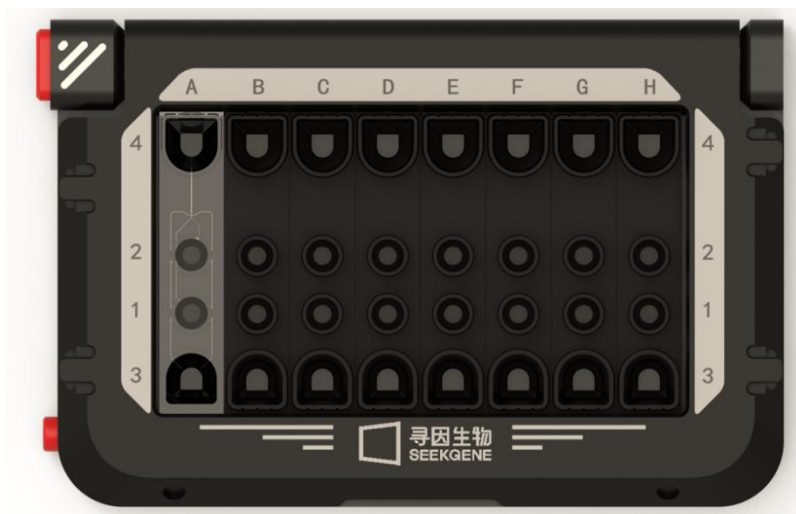
注 1：3×RT Buffer 呈粉红色，若颜色改变或有沉淀析出，则弃用

注 2：ATAC Enzyme T 粘滞度较高，取液时枪头不宜插入液面过深，缓慢吸取，避免挂壁导致的试剂不足。

2. 将 Step 1-2 片段化产物加入到上述反应 Mix 中，吸打混匀，最终单细胞核混合液总体积为 80 μL；

Step 2-3 向 Chip S3 加入试剂

1. 取出对应样本数量的 Chip S3，替换芯片夹具中对应位置的 Chip P，然后将芯片夹具盖上（如下图所示）；



注 1：不加样位置必须放入 Chip P。

注 2：从包装袋中取出对应样本数量的 Chip S3，开封后 24 h 内使用。

2. 将单细胞核反应混合液用移液器吹打混匀后吸取 78 μL ，吸头尖垂直插入标签 1 对应的孔位底部中心稍高于底部平面位置，缓慢注入，不要产生气泡，静置 30 sec；

3. 将室温平衡好的 Barcoded Beads 充分振荡 30 sec，瞬时离心 2 sec，确保 Barcoded Beads 液体没有气泡，用移液器吸取 38 μL ，吸头尖垂直插入标签 2 对应的孔位底部中心稍高于底部平面位置，缓慢注入，不要产生气泡；

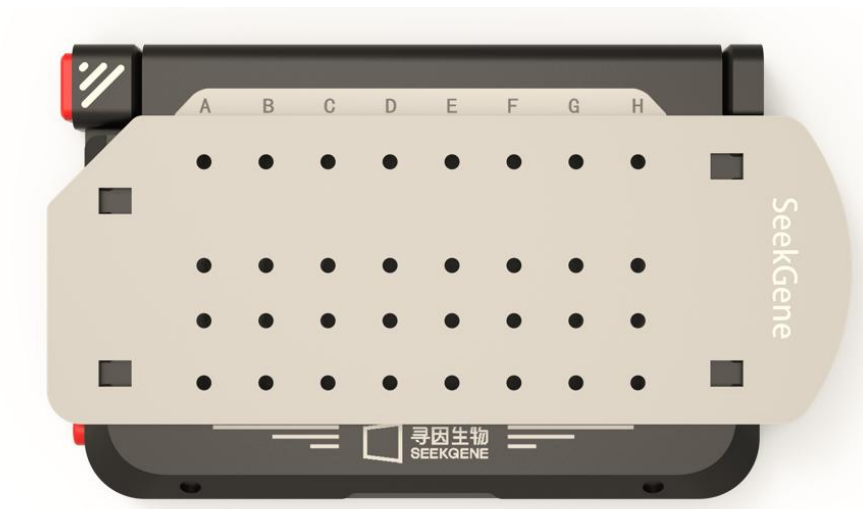
注 1：加试剂时，移液器吸头随着液面移动，始终保持吸头尖在液面 3 mm 以下，避免产生气泡；

注 2：Barcoded Beads 液体粘稠，吸取到设定量程后枪尖在试剂管中等待 5 sec 再取出加样。

4. 用 200 μL 移液器吸取 120 μL Carrier Oil，插入标签 3 对应的孔位，斜靠内壁，缓慢注入，不要产生气泡；重复此步骤一次，共加入 240 μL Carrier Oil。

注：Carrier Oil 添加失败，可能导致油包水生成失败或损坏仪器。

5. 按图示将 Gasket 挂载于芯片夹具上层，确保 Gasket 孔和芯片孔对齐。



注：手不要触碰 Gasket 光滑面，取用时捏住两端空白处。

Step 2-4 运行 SeekOne® DD

1. 点击 SeekOne® DD 上的“出仓”按钮，弹出托盘；



2. 根据图示将覆盖 Gasket 的芯片夹具放入托盘，确保夹具水平放置，点击“进仓”按钮，收回夹具托盘；



3.在仪器屏幕上点击“scATAC+RNA 双组学”程序和“确认”按钮，启动程序；



4. 程序运行结束后，点击“出仓”按钮，取出夹具。立即进行下一步实验。



Step 2-5 转移生成的油包水

1. 在冰上放置一个新的 0.2 mL PCR 管；
2. 取下 Gasket，根据图示按住 PUSH 按钮，打开夹具盖，使芯片与水平成 45°放置；



3. 观察标签 1 和 2 对应孔中的单细胞核混合液和 Barcoded Beads 溶液体积，任一孔剩余体积异常表明芯片有堵塞；

注：1 号孔剩余应 < 10 μL ，2 号孔剩余应 < 15 μL ，产物总体积约 120 μL 。

4. 使用移液器从标签 4 号对应的孔中缓慢吸取全部油包水液体；

注 1：吸取生成的油包水时，枪尖保持在产物液体中悬空，不紧贴芯片底部吸取，防止挤裂油包水结构，如果底部有多余透明的油，可以用 0.5-10 μL 的小量程枪头吸掉，注意不要带吸走生成的油包水产物。

5. 观察吸头内的液体情况，正常液相呈均一不透明乳浊状

-  6. 将吸头内的油包水沿着置于冰上的 PCR 管壁缓慢 (~20 sec) 注入 PCR 管中，不可离心、振荡，转出的油包水立即进行下一步。

Step 2-6 油包水反应

1. 将 Step 2-5 中装有油包水的 PCR 管，放入 PCR 仪中运行下列程序，PCR 热盖 65°C，体积 100 μ L；

2.

温度	时间
25°C	30 min
42°C	60 min
4°C	Hold (not overnight)

注：若液面高度高于加热块高度，则将油包水产物均一分成两管进行反应，结束后离心合并成一管。

-  3. 此步结束后立即进行下一步操作。

Step 3 破乳和纯化

Step 3-1 实验前准备

- ☐ 提前准备好冰盒；
- ☐ 提前将 Reducing Buffer 从-20°C取出冰上解冻，充分振荡后瞬时离心，置于冰盒上备用；
- ☐ 按需配制 80%乙醇（现用现配，放置时间小于 24 h），单个样本需 1 mL；
- ☐ 提前将 Cleanup Beads 和 DNA 分选磁珠平衡至室温备用。

Step 3-2 油包水破乳

1. 室温下，先向每管油包水液体中加入 3 μ L Buffer S；
2. 再加入 100 μ L Demulsion Agent，室温静置 2 min；
3. 从 PCR 管底部缓慢吸取去除 130 μ L Demulsion Agent/Carrier Oil 混合液，底部留 2~5 μ L 体积的透明混合液，防止吸到上层水相反应液；

注 1：如果破油后上层水相仍出现雾状浑浊反应液，可以重复步骤 2 和 3 进行二次破油。

注 2：如果二次破油后，仍有雾状浑浊液，则去除底部透明混合液后，保留雾状浑浊液与水相一起直接进行下一步纯化反应；

STOPPING POINT：破油后产物可-80°C保存 1 周。

Step 3-3 纯化

1. 按照下表要求配制 Cleanup Mix;

组分	体积/样本
○ Cleanup Beads	195 μ L
● Reducing Buffer	5 μ L
Total	200 μ L

2. 向每管样本加入 186 μ L 振荡混匀后的 Cleanup Mix, 轻轻缓慢吹打至少 15 次, 室温孵育 10 min;

注: 加液时混匀时移液器吸头尖随着液面上下移动。

3. 孵育结束后, 将离心管置于磁力架上吸附至溶液澄清, 去除上清;

注: 吸附时可使用移液器吸头朝吸附磁珠面的对侧轻吸混 5 次, 加速磁力吸附。

4. 闭盖瞬时离心 (离心时磁珠吸附管面朝外侧, 防止离心将磁珠甩飞至管壁), 用 10 μ L 移液器去除所有残留的上清;

5. 保持在磁力架上加入 300 μ L 80%乙醇, 约 30 sec 后小心去除上清; 重复此步骤一次;

6. 闭盖瞬时离心 (离心时磁珠吸附管面朝外侧, 防止离心将磁珠甩飞至管壁), 用 10 μ L 移液器去除所有残留的上清;

7. 室温静置使乙醇完全挥发 (磁珠呈现暗哑色, 不干裂, 约 3-5 min), 加入 21.5 μ L Nuclease-free Water 充分悬浮磁珠, 室温静置 5 min;

注 1: 如室内温度过高或过低, 根据磁珠干燥状态缩短或者延长干燥时间, 否则磁珠太过干燥容易成团难以混匀。

注 2: 充分悬浮磁珠推荐先涡旋震散 10-15 sec 后瞬离, 再用枪头吹吸 15 次。

8. 置于磁力架上吸附至溶液澄清, 转移上清 20.5 μ L 至新的 0.2 mL PCR 管中。

注: 吸附时可使用移液器吸头朝吸附磁珠面的对侧轻吸混 5 次, 加速磁力吸附。

Step 4 ATAC 片段和 cDNA 的预扩增与纯化

Step 4-1 实验前准备

- 提前准备好冰盒；
- 提前将 2×PCR Master Mix、cDNA Primers、ATAC Primer 和 Blocker-HM 从-20℃取出冰上解冻，充分振荡后瞬时离心，置于冰盒上备用；
- 按需配制 80%乙醇（现用现配，放置时间小于 24 h），单个样本需 1 mL；
- 提前将 DNA 分选磁珠平衡至室温备用；
- Blocker-HM 仅适用于人和小鼠。

Step 4-2 预扩增

1. 配制预扩增 Mix：

组分	体积/样本
● 2×PCR Master Mix	25 μL
● cDNA Primers	2 μL
● ATAC Primer	1 μL
● Blocker-HM	1.5 μL
Total	29.5 μL

2. 将配制好的 29.5 μL 预扩增 Mix 加入到 Step 3-3 纯化后的 20.5 μL cDNA 产物中，吹打混匀 10 次，瞬时离心，然后进行 PCR。设置 PCR 程序如下，热盖温度 105℃，体积 50 μL：

扩增循环数	温度	时间
	65℃	20 min
	98℃	3 min
	98℃	10 sec
7	60℃	15 sec
	72℃	1 min
	72℃	5 min
	4℃	Hold

STOPPING POINT：预扩增产物可在 4℃过夜；

Step 4-3 预扩增产物纯化

1. 预扩增反应结束后瞬时离心，加入 65 μL DNA 分选磁珠（1.3×），吹打 10 次混匀或振荡混匀；

注：1.3×是指加入的 DNA 分选磁珠与 PCR 产物的体积比，即 65 μL / 50 μL=1.3×。

2. 将混匀好的产物室温静置 5 min 后瞬离，置于磁力架上吸附至溶液澄清，去除上清；

注：吸附时可使用移液器吸头朝吸附磁珠面的对侧轻吸混 5 次，加速磁力吸附。

3. 保持在磁力架上加入 200 μ L 80%乙醇，约 30 sec 后小心去除上清；重复此步骤一次；
4. 闭盖瞬时离心（离心时磁珠吸附管面朝外侧，防止离心将磁珠甩飞至管壁），用 10 μ L 移液器去除所有残留的上清；
5. 开盖室温静置使乙醇完全挥发（磁珠呈现暗哑色，不干裂，约 3-5 min），加入 41 μ L Nuclease-free Water 充分悬浮磁珠，室温静置 5 min 后瞬离；
6. 置于磁力架上吸附至溶液澄清，转移上清 40 μ L 至新的 0.2 mL PCR 管中。

注：吸附时可使用移液器吸头朝吸附磁珠面的对侧轻吸混 5 次，加速磁力吸附。

7. 预扩增纯化产物浓度检测

STOPPING POINT: PCR 纯化产物可在 4°C 保存 72 h 或 -20°C 保存一个月。

Step 5 ATAC 文库扩增与纯化

Step 5-1 实验前准备

- 提前准备好冰盒；
- 提前将 2×PCR Master Mix 和 M4-ATAC-Primers 从-20℃取出冰上解冻，充分振荡后瞬时离心，置于冰盒上备用；
- 按需配制 80%乙醇（现用现配，放置时间小于 24 h），单个样本需 1 mL；
- 提前将 DNA 分选磁珠平衡至室温备用。

Step 5-2 ATAC 片段富集

1. 按照下表配制反应体系，充分振荡混匀，瞬时离心；

组分	体积/样本
● 2× PCR Master Mix	25 μL
● M4-ATAC-Primers	1 μL
Step4-3 纯化产物	X
Nuclease-free Water	24-X μL
Total	50 μL

注：Step4-3 产物浓度若高于 5 ng/μL，则直接取 50 ng 产物进行 ATAC 文库扩增 6 cycle；

Step4-3 产物浓度若低于 5 ng/μL，则直接取 10μL 产物进行 ATAC 文库扩增 7 cycle；

2. 设置 PCR 程序如下，热盖 105℃，体积 50 μL。

扩增循环数	温度	时间
7-6 cycle	98℃	3 min
	98℃	10 sec
	60℃	15 sec
	72℃	1 min
	72℃	5 min
	4℃	Hold

STOPPING POINT: PCR 产物可在 4℃保存 72 h 或-20℃保存一周。

Step 5-3 ATAC 富集产物分选纯化

1. 反应结束后瞬时离心，加入 30 μL DNA 分选磁珠（0.6×），用移液器吹打 10 次混匀或振荡混匀；

注：0.6×是指此步加入的 DNA 分选磁珠与 PCR 产物的体积比，即 30 μL / 50 μL=0.6×。

2. 室温静置 5 min 后瞬离，放置于磁力架吸附至溶液澄清，转移上清至新的 0.2mLPCR 管中；

注：吸附时可使用移液器吸头朝吸附磁珠面的对侧轻吸混 5 次，加速磁力吸附；

注：转移上清时，避免吸到磁珠。

3. 向上清液中加入 35 μL DNA 分选磁珠 (1.3 $\times$)，用移液器吹打 10 次混匀或振荡混匀；

注：1.3 $\times$ 是指加入的 DNA 分选磁珠总体积与 PCR 产物的体积比，即 $(30\ \mu\text{L} + 35\ \mu\text{L}) / 50\ \mu\text{L} = 1.3\times$ 。

4. 室温静置 5 min 后瞬离，放置于磁力架吸附至溶液澄清，去上清液；

注：吸附时可使用移液器吸头朝吸附磁珠面的对侧轻吸混 5 次，加速磁力吸附。

5. 保持在磁力架上加入 200 μL 80%乙醇，约 30 sec 后小心去除上清；重复此步骤一次；

6. 闭盖瞬时离心（离心时磁珠吸附管面朝外侧，防止离心将磁珠甩飞至管壁），用 10 μL 移液器去除所有残留的上清；

7. 室温静置使乙醇完全挥发（磁珠呈现暗哑色，不干裂，约 3-5 min）；

8. 加入 41 μL Nuclease-free Water 充分悬浮磁珠，室温静置 5 min 后瞬离；

9. 置于磁力架上吸附至溶液澄清，转移上清 40 μL 至新的 0.2 mL PCR 管中。

注：吸附时可使用移液器吸头朝吸附磁珠面的对侧轻吸混 5 次，加速磁力吸附。

10. 富集产物浓度检测，ATAC 峰型参照 Step5-6。

STOPPING POINT: PCR 纯化产物可在 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存 72 h 或 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存一个月。

Step 5-4 ATAC 文库扩增

1. 按照下表配制反应体系，充分振荡混匀，瞬时离心；

组分	体积/样本
● 2 $\times$ PCR Master Mix	25 μL
● N5	1 μL
● A7	1 μL
Step5-3 纯化产物	X
Nuclease-free Water	23-X μL
Total	50 μL

注：Step5-3 产物浓度若高于 5 ng/ μL ，则直接取 50 ng 产物进行 ATAC 文库扩增；

Step5-3 产物浓度若低于 5 ng/ μL ，则直接取 10 μL 产物进行 ATAC 文库扩增；

2. 设置 PCR 程序如下，热盖 105 $^{\circ}\text{C}$ ，体积 50 μL 。

扩增循环数	温度	时间
	98 $^{\circ}\text{C}$	3 min
6-9 cycle (见下表)	98 $^{\circ}\text{C}$	20 sec
	54 $^{\circ}\text{C}$	30 sec
	72 $^{\circ}\text{C}$	1 min
	72 $^{\circ}\text{C}$	5 min
	4 $^{\circ}\text{C}$	Hold

产物投入量	推荐扩增循环数
5-10 ng	9-8
10-20 ng	8-7
20-50 ng	7-6

STOPPING POINT: PCR 产物可在 4°C 保存 72 h 或 -20°C 保存一周。

Step 5-5 ATAC 文库扩增产物纯化

1. 反应结束后瞬时离心，加入 65 μL DNA 分选磁珠 (1.3 $\times$)，吹打 10 次混匀或振荡混匀；

注：1.3 $\times$ 是指加入的 DNA 分选磁珠与 PCR 产物的体积比，即 65 μL / 50 μL = 1.3 $\times$ 。

2. 将混匀好的产物室温静置 5 min 后瞬离，置于磁力架上吸附至溶液澄清，去除上清；

注：吸附时可使用移液器吸头朝吸附磁珠面的对侧轻吸混 5 次，加速磁力吸附。

3. 保持在磁力架上加入 200 μL 80%乙醇，约 30 sec 后小心去除上清；重复此步骤一次；

4. 闭盖瞬时离心（离心时磁珠吸附管面朝外侧，防止离心将磁珠甩飞至管壁），用 10 μL 移液器去除所有残留的上清；

5. 开盖室温静置使乙醇完全挥发（磁珠呈现暗哑色，不干裂，约 3-5 min），加入 31 μL Nuclease-free Water 充分悬浮磁珠，室温静置 5 min 后瞬离；

6. 置于磁力架上吸附至溶液澄清，转移上清 30 μL 至新的 0.2 mL PCR 管中。

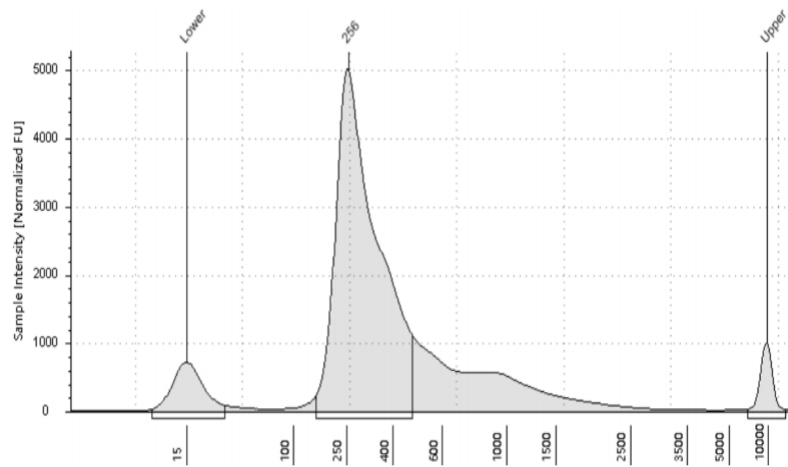
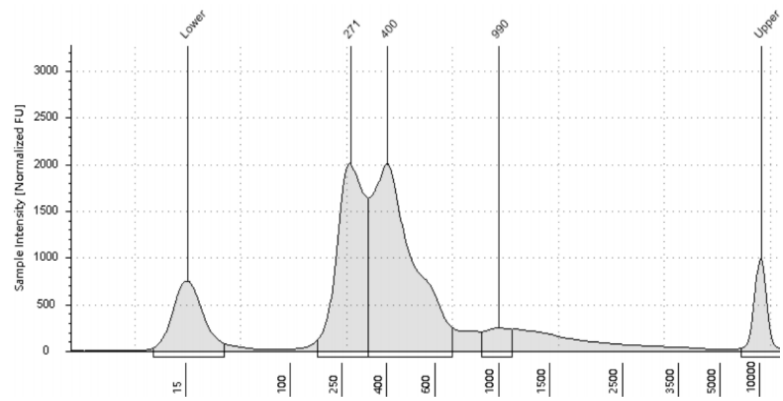
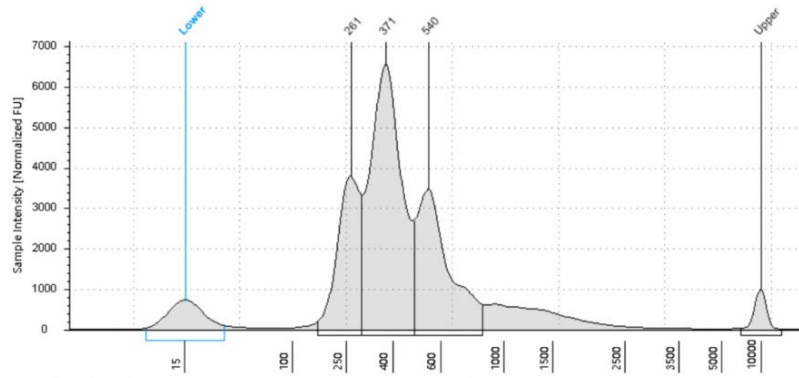
注：吸附时可使用移液器吸头朝吸附磁珠面的对侧轻吸混 5 次，加速磁力吸附。

STOPPING POINT: ATAC 文库纯化产物可 -20°C 下保存不超过 6 个月。

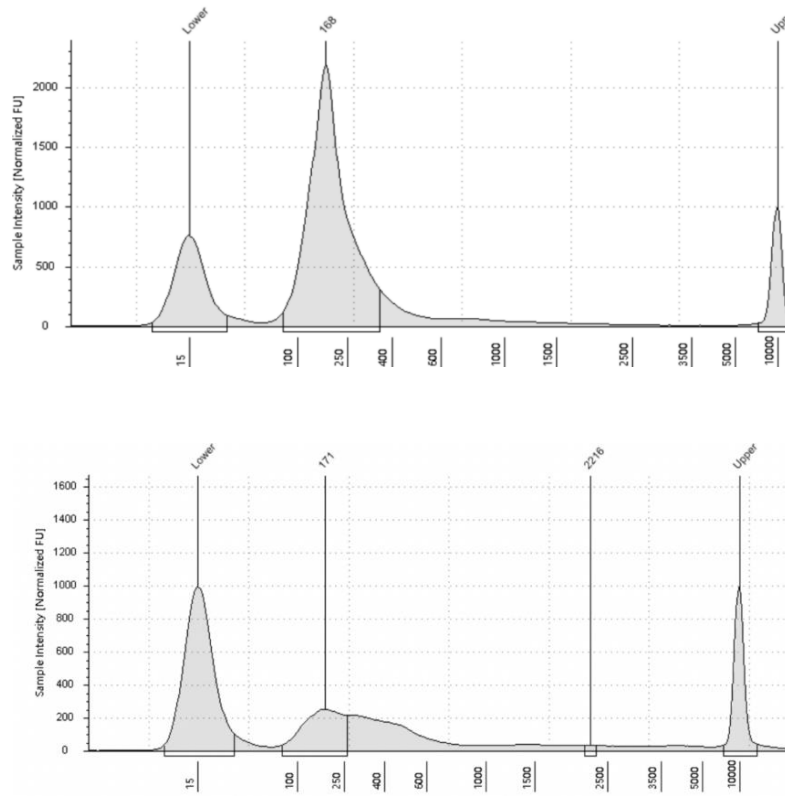
Step 5-6 ATAC 文库质检

由于物种、组织、样品保存、活性状态及样本处理的差异，ATAC 文库核小体相关峰的强度和相对大小会有显著差异。对于 ATAC 文库来说，关键的因素是在 200-1000 bp 范围内展示良好的片段分布，最好在 600 bp 以下，但 ATAC 文库中峰的数量或大小并不与测序数据质量直接相关。

ATAC 文库常见峰型如下，建议测序：



ATAC 文库出现如下峰型，不建议测序。



ATAC 文库峰型合格情况下，文库浓度满足上机需求即可。

注：如 ATAC 文库中大片段 (>800bp) 占比较高，可再次进行 0.5× + 1.1× 分选。

Step 6 转录组文库构建

Step 6-1 实验前准备

- 提前准备好冰盒；
- 提前将 2×PCR Master Mix、cDNA Primers、Blockers-HM、Fragmentation Buffer、Ligation Buffer、Adaptor 从-20℃取出冰上解冻，充分振荡后瞬时离心，于冰盒上备用；
- Fragmentation Enzyme、DNA Ligase 使用前从-20℃取出，瞬时离心后立即使用；
- 按需配制 80%乙醇（现用现配，放置时间小于 24 h），单个样本 2 mL；
- 提前将 DNA 分选磁珠平衡至室温备用；

Step 6-2 cDNA 富集

1. 按照下表配制反应体系，充分振荡混匀，瞬时离心；

组分	体积/样本
● 2×PCR Master Mix	25 μL
● cDNA Primers	2 μL
● Blockers-HM	1.5 μL
Nuclease-free Water	11.5 μL
Total	40 μL

2. 取 10 μL Step4-3 纯化产物加入到上述配置好的反应体系中，震荡混匀，瞬时离心，进行 PCR 反应，设置 PCR 程序如下，热盖 105℃，体积 50 μL。

扩增循环数	温度	时间
8	98℃	3 min
	98℃	10 sec
	63℃	15 sec
	72℃	1 min
	72℃	5 min
	4℃	Hold

STOPPING POINT: PCR 产物可在 4℃保存 72 h 或-20℃保存一周。

Step6-3 cDNA 富集产物纯化

1. 反应结束后瞬时离心，加入 35 μL DNA 分选磁珠（0.7×），吹打 10 次混匀或振荡混匀；

注：0.7×是指加入的 DNA 分选磁珠与 PCR 产物的体积比，即 35 μL / 50 μL=0.7×。

2. 将混匀好的产物室温静置 5 min 后瞬离，置于磁力架上吸附至溶液澄清，去除上清；

注：吸附时可使用移液器吸头朝吸附磁珠面的对侧轻吸混 5 次，加速磁力吸附。

3. 保持在磁力架上加入 200 μL 80%乙醇，约 30 sec 后小心去除上清；重复此步骤一次；

4. 闭盖瞬时离心（离心时磁珠吸附管面朝外侧，防止离心将磁珠甩飞至管壁），用 10 μL 移液器去除所有残留的上清；

5. 开盖室温静置使乙醇完全挥发（磁珠呈现暗哑色，不干裂，约 3-5 min），加入 41 μL Nuclease-free Water 充分悬浮磁珠，室温静置 5 min 后瞬离；

6. 置于磁力架上吸附至溶液澄清，转移上清 40 μL 至新的 0.2 mL PCR 管中。

注：吸附时可使用移液器吸头朝吸附磁珠面的对侧轻吸混 5 次，加速磁力吸附。

STOPPING POINT: cDNA 纯化产物可在 4℃ 保存 72 h 或 -20℃ 保存一个月。

Step 6-4 cDNA 富集产物质检

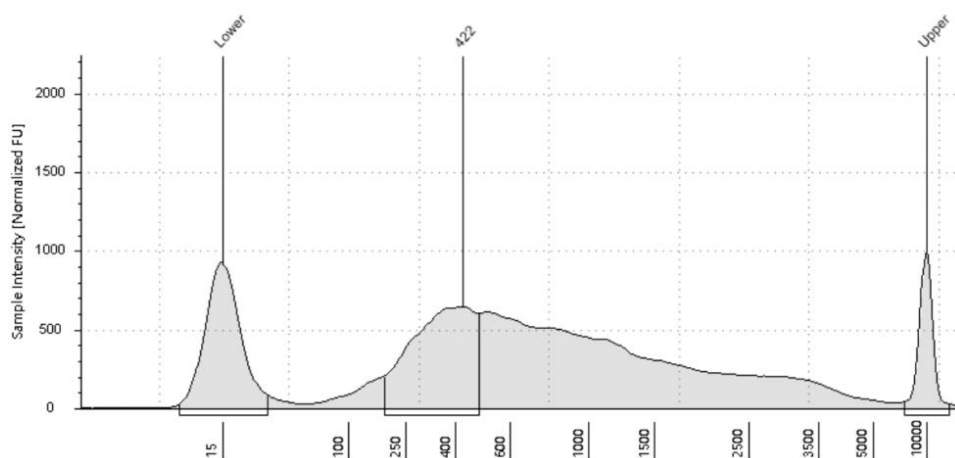
1) 捕获 1000-6,000 个细胞，cDNA 富集产物浓度(Qubit) $\geq 1 \text{ ng}/\mu\text{L}$ ，峰型片段范围在 250-5,000 bp，主峰在 250-2,500 bp 范围（Agilent 4200 TapeStation），判定合格；

2) 捕获 6,000-12,000 个细胞，cDNA 富集产物浓度 $\geq 3 \text{ ng}/\mu\text{L}$ ，峰型片段范围在 250 -5,000 bp，主峰在 250-2,500 bp 范围，判定合格；

3) $0.5 \text{ ng}/\mu\text{L} \leq \text{cDNA 富集产物浓度} < 1 \text{ ng}/\mu\text{L}$ ，峰型片段范围在 250 -5,000 bp，主峰在 250-2,500 bp 范围，或 cDNA 富集产物浓度 $\geq 1 \text{ ng}/\mu\text{L}$ ，峰型片段范围在 250 -5,000 bp，主峰不在 250-2,500 bp 范围，提示风险；

4) cDNA 富集产物浓度 $< 0.5 \text{ ng}/\mu\text{L}$ ，或峰型片段范围在 250-5,000 bp 无目的片段，无明显主峰，判定不合格。

注：如果有小片段再进行一次 0.8 $\times$ 纯化，直至无小片段。



Step 6-5 DNA 片段化与末端修复

- 按照下表设置程序，并运行 PCR 仪，PCR 仪热盖 65℃，体积 50 μL；

步骤	温度	时间
1	4℃	Pause
2	32℃	2 min
3	65℃	30 min
4	4℃	Hold

- 按照下表配制反应体系，振荡混匀，瞬时离心，冰上备用，每个样本取 50-100ng 总量 cDNA 为模板，计算模板加样体积，补加对应体积的无酶水完成体系配置；若 cDNA 总量不足 50 ng，则每个样本取 10 μL 进行后续打断反应。

组分	体积/样本
cDNA 富集产物(Step6-3)	X μL
Nuclease-free Water	35-X μL
Fragmentation Buffer	5 μL
Total	40 μL

- 每个反应体系中加入 10 μL Fragmentation Enzyme（冰上操作），冰上吹打 15 次，瞬时离心；
- 立即将混匀好的反应试剂放入已运行的 PCR 仪中，点击“下一步”继续运行 PCR 程序。

Step 6-6 接头连接

- 按照下表配制反应体系，充分振荡混匀，瞬时离心；

组分	体积/样本
● Ligation Buffer	20 μL
● DNA Ligase	5 μL
● Adaptor	5 μL
Nuclease-free Water	20 μL
Total	50 μL

- 将 50 μL 反应体系加入到片段化产物中，用移液器吹打 15 次混匀，瞬时离心；
- 按照下表设置 PCR 程序，进行反应，PCR 仪热盖 30℃，体积 100 μL；

步骤	温度	时间
1	20℃	15 min
2	4℃	Hold

Step 6-7 连接产物纯化

1. 反应结束后瞬时离心，加入 80 μ L DNA 分选磁珠（0.8 $\times$ ），用移液器吹打 10 次混匀或振荡混匀；

注：0.8 $\times$ 是指加入的 DNA 分选磁珠与连接产物的体积比，即 80 μ L / 100 μ L = 0.8 $\times$ 。

2. 将混匀好的产物室温静置 10 min 后，置于磁力架上吸附至溶液澄清，去除上清；

注：吸附时使用移液器吸头朝吸附磁珠面的对侧轻吸混 5 次，加速磁力吸附。

3. 保持在磁力架上加入 300 μ L 80%乙醇，约 30 sec 后小心去除上清乙醇；重复此步骤一次；

4. 去除上清后，进行瞬时离心，用 10 μ L 移液器去除所有残留的上清乙醇，离心时磁珠吸附管面朝外侧，防止离心将磁珠甩飞至管壁；

5. 室温静置 3-5 min 使乙醇完全挥发（磁珠呈现暗哑色，不干裂）；

6. 加入 24 μ L Nuclease-free Water 充分悬浮磁珠，室温静置 2 min 后瞬离；

7. 置于磁力架上吸附至溶液澄清，转移上清 23 μ L 至新的 0.2 mL PCR 管中。

注：吸附时使用移液器吸头朝吸附磁珠面的对侧轻吸混 5 次，加速磁力吸附。

Step 6-8 转录组文库扩增

1. 按照下表配制反应体系，充分振荡混匀，瞬时离心；

组分	体积/样本
● 2 $\times$ PCR Master Mix	25 μ L
● N5	1 μ L
● N7	1 μ L
Total	27 μ L

注：若样本多可以采购 96 孔板 index 单品，此单品 index 种类更多，且是单孔是 I5 和 I7 混合标签，用于样本量大、包 lane 的测序策略，使用量混匀后直接吸取 2 μ L 添加到扩增体系中，产品货号 K02001-96。

2. 取 27 μ L 反应体系加入到连接纯化产物中，用移液器吹打 15 次混匀，瞬时离心；

3. 按照下列条件设置 PCR 程序，进行反应，热盖 105 $^{\circ}$ C，体积 50 μ L。

扩增循环数	温度	时间
9-16 (见下表)	98 $^{\circ}$ C	3 min
	98 $^{\circ}$ C	20 sec
	54 $^{\circ}$ C	30 sec
	72 $^{\circ}$ C	20 sec
	72 $^{\circ}$ C	5 min
	4 $^{\circ}$ C	Hold

cDNA 投入量	推荐扩增循环数
1-50 ng	16-11
50-100 ng	11-9

Step 6-9 转录组文库纯化

1. 反应结束后瞬时离心，加入 40 μ L DNA 分选磁珠（0.8 $\times$ ），用移液器吹打 10 次混匀或振荡混匀；

注：0.8 $\times$ 是指加入的 DNA 分选磁珠与 PCR 产物的体积比，即 40 μ L / 50 μ L=0.8 $\times$ 。

2. 室温静置 5 min 后瞬离，放置于磁力架吸附至溶液澄清，去除上清；

注：吸附时使用移液器吸头朝吸附磁珠面的对侧轻吸混 5 次，加速磁力吸附。

3. 加入 200 μ L 80%乙醇（保持放置在磁力架上），约 30 sec 后小心去除上清乙醇；重复此步骤一次；

4. 将 PCR 管进行瞬时离心，用 10 μ L 移液器去除所有残留的上清乙醇，离心时磁珠吸附管面朝外侧，防止离心将磁珠甩飞至管壁；

5. 室温静置 3-5 min 使乙醇完全挥发（磁珠呈现暗哑色且不开裂）；

6. 加入 31 μ L Nuclease-free Water 充分悬浮磁珠，室温静置 2 min 后瞬离；

7. 然后置于磁力架上吸附至溶液澄清，转移上清 30 μ L 至新的 0.2 mL PCR 管中。

注：吸附时使用移液器吸头朝吸附磁珠面的对侧轻吸混 5 次，加速磁力吸附。

STOPPING POINT: 文库产物纯化后可在-20 $^{\circ}$ C下储存不超过 6 个月。

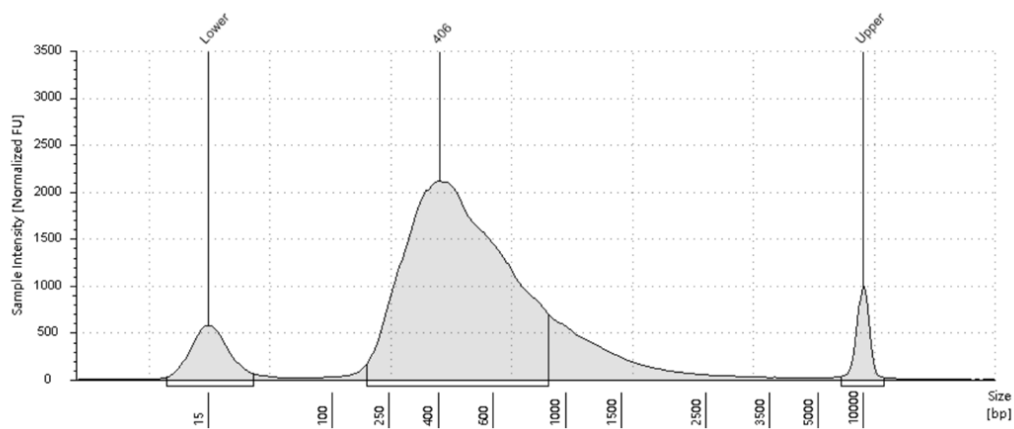
Step 6-10 转录组文库质控标准

1. 文库浓度(Qubit) $\geq$ 5 ng/ μ L 无小片段污染，主峰在 300-700bp 范围(Agilent 4200 TapeStation)，判定合格；

2. 1 ng/ μ L $\leq$ 文库浓度 $<$ 5 ng/ μ L，主峰在 300-700bp 范围，无小片段污染，可风险上机；

3. 文库浓度 $\geq$ 5 ng/ μ L，产物峰形片段范围在 300-700bp，但有小片段污染，小片段高度低于目标片段高度，再次纯化直至无小片段，可风险上机；

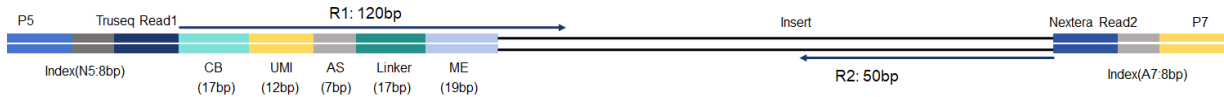
4. 文库浓度 $<$ 1 ng/ μ L，或产物峰形检测在 300-700bp 无目的片段，无明显主峰，或小片段高度高于目标片段高度，判定不合格。



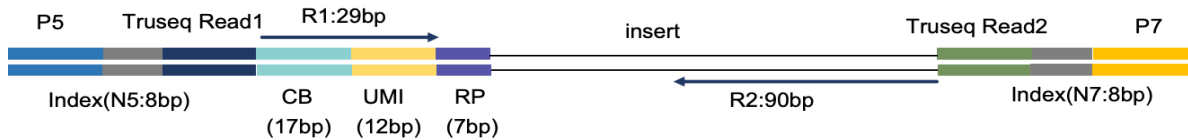
注：如果有小片段再进行一次 0.8×纯化，直至无小片段。

附录 1 高通量测序

1. 测序文库：SeekOne® DD 单细胞 ATAC 文库以 P5 开始，P7 结束，其中 cell barcode 长度为 17 bp，UMI 长度为 12 bp，连接序列包含 24 bp（7+17），Tn5 ME 序列 19 bp，样本双端 index 分别为 8 bp 的 N5 和 A7。通过文库的测序，可以获得用于单细胞标准分析的基本数据 FASTQ。



2. 测序文库：SeekOne® DD 单细胞转录组文库以 P5 开始，P7 结束，其中 cell barcode 包含 17 bp，UMI 包含 12 bp，样本双端 index 分别为 8 bp 的 N5 和 N7。通过文库的测序，可以获得用于单细胞标准分析的基本数据 FASTQ。



3. 测序平台：此试剂盒构建的单细胞文库可适配于真迈测序和 Illumina 测序平台。

1) 真迈平台：SURFSeq5000;

2) Illumina 平台：MiSeq、NextSeq 500/550、NextSeq 1000/2000、HiSeq 2500(Rapid Run)、HiSeq 3000/4000、NovaSeq。

4. 文库测序深度及运行参数：

	单细胞 ATAC 文库	单细胞转录组文库
测序深度	≥25,000 reads/nucleus 推荐≥50,000 reads/nucleus	≥25,000 reads/nucleus 推荐≥50,000 reads/nucleus
测序类型	双端测序	双端测序
测序读长	Read1: ≥120bp A7 Index: 8 bp N5 Index: 8 bp Read2: ≥50 bp	Read1: ≥29 bp N7 Index: 8 bp N5 Index: 8 bp Read2: ≥90 bp

5. 文库上样量

平台	仪器	上样浓度 (pM)	推荐 PhiX 比例 (%)
真迈平台	SURFSeq 5000	200	≥5%
Illumina 平台	MiSeq	11	≥10%
	NextSeq 500/550	1.8	≥10%
	HiSeq 2500(RR)	11	≥10%
	HiSeq 4000	240	≥10%
	NovaSeq	150*/300	≥10%

注：Use 150 pM loading concentration for Illumina XP workflow。

6. 文库 pooling: 为了减少平衡文库使用比例, 强烈建议 ATAC 文库和转录组文库使用不同的 index, ATAC 和 RNA 文库 pooling 到同一条 lane 中测序可以改善碱基不平衡造成的质量值降低。

附录 2 生物信息学分析

1. 分析软件：单细胞数据分析采用北京寻因生物自主研发的 SeekArc Tools;

SeekArc Tools 可识别 Cell Barcode，比对定量，得到下游分析的细胞表达矩阵，用于后续的细胞聚类和差异分析。

1) 输入文件：FASTQ (clean data)

2) 输出文件：bam,html, csv,matrix(filtered_feature_bc_matrix,raw_feature_bc_matrix)

3) 操作系统：Linux

2. 软件获得：点击 <http://seekarc.seekgene.com/zh/v1.0.0/index.html> 可获得该软件包及安装说明。

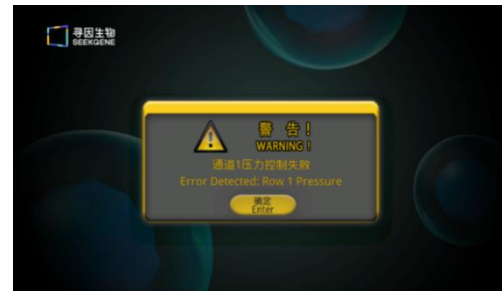
附录 3 SeekOne® 数字液滴仪使用说明

详见《SeekOne® 数字液滴仪使用说明》。

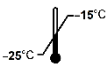
附录 4 SeekOne® 数字液滴仪故障处理

设备在运行过程中，可能会出现问题。下表为故障类型及处理方法。在设备出现故障时，用户可以先根据下表进行故障排查并处理，如果不能将故障排除，请及时与我公司联系。

故障类型	解决方案
	请确保设备正确安装，点击“确定”可重新自检，或重新启动设备。若反复出现该信息，内部硬件可能出现问题，强制使用将导致仪器损坏，请联系（support@seekgene.com）以获得进一步帮助。
	进出仓运行有可能受阻，请确认运行路径上无物体阻挡后点击提示窗的“确定”按钮后，仪器会继续下一步动作。若反复出现该信息，请联系（support@seekgene.com）以获得进一步帮助。
	进出仓运行有可能受阻，请确认运行路径上无物体阻挡后点击提示窗的“确定”按钮后，仪器会继续下一步动作。若反复出现该信息，请联系（support@seekgene.com）以获得进一步帮助。
	请再次重试或重新开机操作。若反复出现该信息，请联系（support@seekgene.com）以获得进一步帮助。

	请确认密封垫是否被正确安装在芯片夹具上，并重新定位芯片夹具。检查芯片仓表面是否有异物存在，并清洁表面。若反复出现该信息，请联系（support@seekgene.com）以获得进一步帮助。
	重新启动设备，如反复出现，请联系（support@seekgene.com）以获得进一步帮助。
	请检查密封垫上是否洁净，芯片外观是否有残缺，芯片夹具是否正确安装。如果有密封垫污垢或芯片外观残缺，请更换密封垫或芯片后重新尝试。如果再次出现错误信息，请联系（support@seekgene.com）以获得进一步帮助。
	请检查密封垫上是否洁净，芯片外观是否有残缺，芯片夹具是否正确安装。如果有密封垫污垢或芯片外观残缺，请更换密封垫或芯片后重新尝试。如果再次出现错误信息，请联系（support@seekgene.com）以获得进一步帮助。

附录 5 包装符号释义

	制造商		欧盟代表
	体外诊断产品		保质期
	产品批次		产品货号
	试剂盒货号		试剂瓶货号
	产品识别码		查阅使用说明书
	避免雨淋		避光保存
	如果包装损坏，请不要使用		注意
	生物危害		易碎
	储存温度为 -25 ~ -15°C		CE 标识
	储存温度为 2 ~ 8°C		储存温度为 -80°C

附录 6 修订历史

序号	变更类型	修改条款及主要内容	生效日期
1	新建	新建文件	2025.04.11