

SeekOne[®] DD 单细胞全序列转录组试剂盒 操作说明书

V1.2

K00202-0201 & K00801-0202 & K00801-0203 & K00202-0204 & K00202-0205 & K00801-0206
K00202-0801 & K00801-0802 & K00801-0803 & K00202-0804 & K00202-0805 & K00801-0806

Envision the Future
预见未来

北京寻因生物科技有限公司

目录

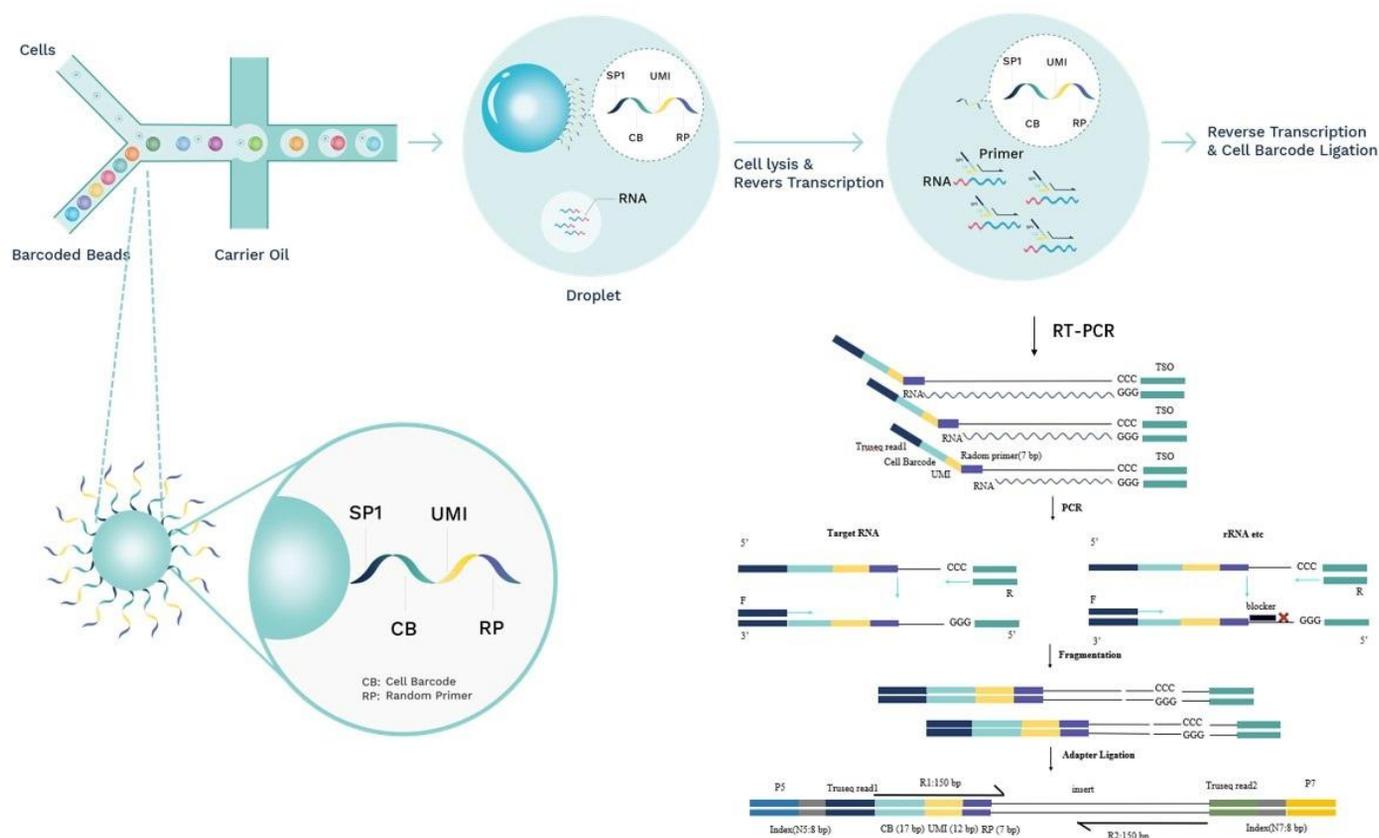
产品简介	2
实验原理	2
样本要求	3
1. 样本类型要求	3
2. 样本质量要求	3
3. 样本储存要求	3
上样量建议	3
产品组分及保存条件	3
保存条件	6
Index 序列	6
参数说明	6
配套使用的仪器和耗材	6
需自备的仪器和试剂	8
1. 自备仪器及耗材	8
2. 自备试剂/试剂盒	8
实验操作步骤	9
Step 1 油包水生成及 Barcode 标记	9
Step 1-1 准备单细胞混合液	10
Step 1-2 向 Chip S3 加入试剂	11
Step 1-3 运行 SeekOne® DD	12
Step 1-4 转移生成的油包水	13
Step 1-5 油包水逆转录反应	14
Step 2 样本回收和 cDNA 富集扩增	14
Step 2-1 油包水破乳	14
Step 2-2 cDNA 富集	15
Step 2-3 cDNA 富集产物纯化	16
Step 2-4 cDNA 二次富集	16
Step 2-5 cDNA 二次富集产物纯化	17
Step 2-6 cDNA 富集产物质检标准	17
Step 3 文库构建	18
Step 3-1 DNA 片段化与末端修复	18
Step 3-2 接头连接	18
Step 3-3 连接产物纯化	19
Step 3-4 文库扩增	19
Step 3-5 文库纯化	19
Step 3-6 文库质控标准	20
附录 1: 高通量测序	22
附录 2: 生物信息学分析	23
附录 3: SeekOne® 数字液滴仪使用说明	23
附录 4: SeekOne® 数字液滴仪故障处理	23
附录 5: 包装符号释义	25
附录 6: 修订历史	26

产品简介

SeekOne® DD (Digital Droplet) 单细胞全序列转录组试剂盒是由北京寻因生物科技有限公司自主研发的国际首款商业化的高通量的单细胞全转录组试剂盒。该试剂盒突破传统 3'或 5'端转录组只能分析 mRNA 一端序列的局限，利用微流控数字液滴和偶联有随机引物的 **Barcoded Beads**，实现全转录组的随机捕获和检测。该试剂盒需配合本公司自主研发的 SeekOne® 数字液滴仪（SeekOne® Digital Droplet System，简称 SeekOne® DD）完成从单细胞核酸标记到转录组文库构建的全过程，同时配备单细胞数据分析软件 SeekSoul Tools，为您提供一站式单细胞转录组解决方案。

SeekOne® DD 单细胞全序列转录组试剂盒包括：芯片（SeekOne® DD Chip S3，简称 Chip S3）、垫片（Gasket）、油（Carrier Oil）、凝胶微珠（SeekOne® DD Barcoded Beads，简称 Barcoded Beads）、扩增试剂、文库构建试剂以及单细胞数据分析软件（SeekSoul Tools）。该试剂盒基于微流控技术原理，通过油包水实现单细胞分离捕获，利用核酸修饰的 Barcoded Beads 对不同细胞来源的 RNA 分别进行分子标记，利用随机引物抓取全长范围的 coding 和 noncoding RNA，并以寻因创新的 blocker 技术去除细胞内的 rRNA 和线粒体污染，最终构建兼容 Illumina 测序平台的高通量单细胞转录组文库，可用于肿瘤、免疫、细胞发育、病毒感染、用药指导及靶标筛选等研究。

实验原理



样本要求

1. 样本类型要求

□单细胞悬液：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；无钙镁离子，FBS≤2%，BSA≤0.1%（过高的 BSA 浓度会导致破油不完全从而影响细胞捕获率和基因数）；

□细胞直径：5-40 μm。

2. 样本质量要求

□细胞数：细胞建议活细胞量 5 万以上，最低投入细胞数不少于 1,000；

□细胞活性：细胞活率>90%分析效果最佳；细胞核 AO/PI 荧光染色活率<5%，且 40 倍镜下台盼蓝染色核膜完整无破损（细胞计数仪进行计数）；

□细胞结团率<10%，细胞有核率>70%，细胞核杂质占比低于 30%且杂质直径不超过 40 μm。

3. 样本储存要求

新鲜单细胞悬液，冰上放置，20 min 内完成油包水捕获实验效果最佳。时间超过建议使用 4 mL 的 1640+2%FBS 离心重悬清洗一次。

注 1：实验开始前，需利用细胞计数仪对单细胞悬液进行细胞计数以及活细胞率计算。

注 2：细胞核建议使用推荐固定方案，如有需求请联系对应的客户经理。

上样量建议

细胞使用 RPMI 1640 培养基重悬，活细胞浓度范围：700-1,200 cells/μL。

产品组分及保存条件

SeekOne® DD 单细胞全序列转录组试剂盒按照试剂功能及储存条件分为：SeekOne® DD S3 芯片试剂盒、SeekOne® DD 单细胞纯化试剂盒、SeekOne® DD 单细胞全序列微珠试剂盒、SeekOne® DD 单细胞全序列逆转录试剂盒、SeekOne® DD 单细胞全序列 cDNA 扩增试剂盒和 SeekOne® DD 文库构建试剂盒。

名称	管盖颜色	组分	REF	2 tests
SeekOne® DD S3 芯片试剂盒 V1.0 K00202-0201	-	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 单细胞全序列 微珠试剂盒 V1.2 K00801-0202	○	Single Cell Whole Transcriptome Barcoded Beads	R0008601	45 μL ×2 管
	○	TSO	R0003601	10 μL
SeekOne® DD 单细胞全序列 逆转录试剂盒 V1.2 K00801-0203	●	3×RT Buffer	R0008401	80 μL
	●	RT Enzyme	R0003801	15 μL
	●	Reducing Buffer	R0003901	100 μL
SeekOne® DD 单细胞全序列 cDNA 扩增试剂盒 V1.2 K00801-0206	●	2×PCR Master Mix	R0002101	60 μL ×2 管
	●	Blockers-HM	R0008501	10 μL
	●	cDNA Primers	R0004001	10 μL
SeekOne® DD 文库构建试剂盒 V1.0 K00202-0204	●	Fragmentation Buffer	R0004101	15 μL
	●	Fragmentation Enzyme	R0004201	24 μL
	●	Ligation Buffer	R0004301	60 μL
	●	DNA Ligase	R0004401	15 μL
	●	Adaptor	R0004501	15 μL
	●	2×PCR Master Mix	R0002101	60 μL
	●	N501	R0004601	25 μL
	●	N502	R0004701	25 μL
	●	N701	R0005001	25 μL
●	N702	R0005101	25 μL	
SeekOne® DD 单细胞纯化试剂盒 V1.0 K00202-0205	○	Cleanup Beads	R0003401	0.5 mL

名称	管盖颜色	组分	REF	8 tests
SeekOne® DD S3 芯片试剂盒 V1.0 K00202-0801	-	SeekOne® DD Chip S3	R0003001	8 张
	-	Gasket	R0003101	8 张
	●	Carrier Oil	R0003202	1.2 mL×2 管
	●	Demulsion Agent	R0003302	1.8 mL
SeekOne® DD 单细胞全序列 微珠试剂盒 V1.2 K00801-0802	○	Single Cell Whole Transcriptome Barcoded Beads	R0008601	45 μL ×8 管
	○	TSO	R0003602	20 μL
SeekOne® DD 单细胞全序列 逆转录试剂盒 V1.2 K00801-0803	●	3×RT Buffer	R0008402	280 μL
	●	RT Enzyme	R0003802	50 μL
	●	Reducing Buffer	R0003901	100 μL
SeekOne® DD 单细胞全序列 cDNA 扩增试剂盒 V1.2 K00801-0806	●	2×PCR Master Mix	R0002102	240 μL×2 管
	●	Blockers-HM	R0008502	30 μL
	●	cDNA Primers	R0004003	40 μL
SeekOne® DD 文库构建试剂盒 V1.0 K00202-0804	●	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
	●	N703	R0005201	25 μL
	●	N704	R0005301	25 μL
SeekOne® DD 单细胞纯化试剂盒 V1.0 K00202-0805	○	Cleanup Beads	R0003402	1.75 mL

保存条件

- SeekOne® DD S3 芯片试剂盒：室温保存，常温运输；
 SeekOne® DD 单细胞纯化试剂盒：2~8℃保存，常温运输；
 SeekOne® DD 单细胞全序列微珠试剂盒：-80℃保存，干冰运输；
 SeekOne® DD 单细胞全序列逆转录试剂盒：-20±5℃保存，干冰运输；
 SeekOne® DD 单细胞全序列 cDNA 扩增试剂盒：-20±5℃保存，干冰运输；
 SeekOne® DD 文库构建试剂盒：-20±5℃保存，干冰运输。

Index 序列

Index 号	正向序列
●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：

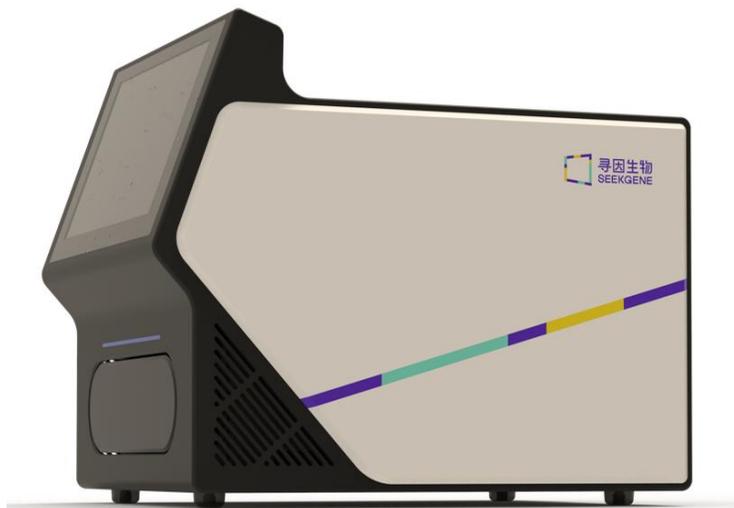
N5	5' AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC[N5]ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT 3'
N7	5' GATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCAC[N7]ATCTCGTATGCCGTCTTCTGCTTG 3'

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. 双胞率：1,000 个细胞约 0.3%。

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。



需自备的仪器和试剂

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 北京寻因生物, M002C
0.2 mL 24 孔磁力架	Mich Scientific, Magpow-24
1.5 mL 12 孔磁力架	-
移液器	Eppendorf /RAININ (2.5 μ L/10 μ L/20 μ L/200 μ L/1,000 μ L) Agilent, G2991AA (Agilent 4200 TapeStation 系统)
核酸片段分析仪	Agilent, G2939BA (Agilent 2100 生物分析仪) Bioptic, Qsep400 (Qsep400) Thermo Fisher Scientific, 4375786
PCR 仪	Long Gene, A300 深模 BioRad, 1851196 (C1000)
0.2 mL PCR 管	Axygen, PCR-02-L-C
0.2 mL 八联排管	Axygen, PCR-2CP-RT-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 圆周振荡器及附件)
恒温混匀仪	杭州瑞城, TCS10
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

2. 自备试剂/试剂盒

试剂名称	推荐品牌及货号
1 \times 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
High Sensitivity D1000 ScreenTape/Reagents	Agilent, 5067-5592/ 5067-5593
High Sensitivity D5000 ScreenTape/Reagents	Agilent, 5067-5584/ 5067-5585
RPMI 1640 培养基	Gibco, 11875093
S2-标准定量试剂盒	Bioptic, C105201/C105801/C405101
S1-高分辨率定量试剂盒	Bioptic, C105202/C105802/C405102

实验操作步骤

Step 1 油包水生成及 Barcode 标记

实验前准备

- 提前准备好冰盒；
- 提前将 3×RT Buffer、Reducing Buffer 从-20℃取出解冻，充分振荡后瞬时离心，置于冰盒上备用；
- RT Enzyme 使用前从-20℃取出，瞬时离心后立即使用；
- 提前从-80℃冰箱取出 Barcoded Beads，室温平衡 30 min 备用；
- 提前从-80℃取出 TSO 于湿冰上解冻，充分振荡后瞬时离心，置于冰盒上备用；
- 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；
- 深孔 PCR 仪程序设置梯度变温。

注：提前预备的胶珠如果中途实验取消不进行上机，待胶珠平衡至 30 min 彻底融化再收回-80℃冰箱，短时间内的冻融容易导致胶珠密度、粘稠度改变。

Step 1-1 准备单细胞混合液

1. 按照下表冰上配制 Mix，吹打 15 次混匀，瞬时离心（一定要先按下表配制成反应 Mix 后再使用）；

组分	体积/样本
● 3×RT Buffer	26.6 μL
● RT Enzyme	5.2 μL
○ TSO	2.0 μL
● Reducing Buffer	1.6 μL
Total	35.4 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：RT Enzyme 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. 确定捕获细胞数，先加入相应体积（44.6 (μL) - 下表对应的单细胞悬液体积 (μL)）的 Nuclease-free Water 至 Mix 吹打混匀；再加入下表对应的单细胞悬液（单细胞悬液加入前需吹打混匀）；最终单细胞混合液总体积为 80 μL 。

Cell Stock Concentration (Cells/ μL)	Targeted Cell Recovery												
	500	1,000	2,000	3,000	4,000	5,000	6,000	7,000	8,000	9,000	10,000	11,000	12,000
300	3.3	6.7	13.3	20.0	26.7	n	n	n	n	n	n	n	n
400	2.5	5.0	10.0	15.0	20.0	25.0	30.0	n/a	n	n	n	n	n
500	2.0	4.0	8.0	12.0	16.0	20.0	24.0	28.0	32.0	n	n	n	n
600	1.7	3.3	6.7	10.0	13.3	16.7	20.0	23.3	26.7	30.0	n	n	n
700	1.4	2.9	5.7	8.6	11.4	14.3	17.1	20.0	22.9	25.7	28.6	31.4	n
800	1.3	2.5	5.0	7.5	10.0	12.5	15.0	17.5	20.0	22.5	25.0	27.5	30.0
900	1.1	2.2	4.4	6.7	8.9	11.1	13.3	15.6	17.8	20.0	22.2	24.4	26.7
1,000	1.0	2.0	4.0	6.0	8.0	10.0	12.0	14.0	16.0	18.0	20.0	22.0	24.0
1,100	0.9	1.8	3.6	5.5	7.3	9.1	10.9	12.7	14.5	16.4	18.2	20.0	21.8
1,200	0.8	1.7	3.3	5.0	6.7	8.3	10.0	11.7	13.3	15.0	16.7	18.3	20.0
1,300	0.8	1.5	3.1	4.6	6.2	7.7	9.2	10.8	12.3	13.8	15.4	16.9	18.5
1,400	0.7	1.4	2.9	4.3	5.7	7.1	8.6	10.0	11.4	12.9	14.3	15.7	17.1
1,500	0.7	1.3	2.7	4.0	5.3	6.7	8.0	9.3	10.7	12.0	13.3	14.7	16.0
1,600	0.6	1.3	2.5	3.8	5.0	6.3	7.5	8.8	10.0	11.3	12.5	13.8	15.0
1,700	0.6	1.2	2.4	3.5	4.7	5.9	7.1	8.2	9.4	10.6	11.8	12.9	14.1
1,800	0.6	1.1	2.2	3.3	4.4	5.6	6.7	7.8	8.9	10.0	11.1	12.2	13.3
1,900	0.5	1.1	2.1	3.2	4.2	5.3	6.3	7.4	8.4	9.5	10.5	11.6	12.6
2,000	0.5	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0	6.0	7.0	8.0	9.0	10.0	11.0	12.0

注 1：Nuclease-free Water 不能直接加到细胞悬液中，需要先加到 Mix 中；然后再加入对应体积的单细胞悬液。多样本同时上机待所有样本补水完成后再加入混匀的单细胞悬液，减少操作时间，防止细胞长时间在 Mix 中活性降低。

注 2：蓝色背景标注为最佳的单细胞悬液原液浓度范围。

Step 1-2 向 Chip S3 加入试剂

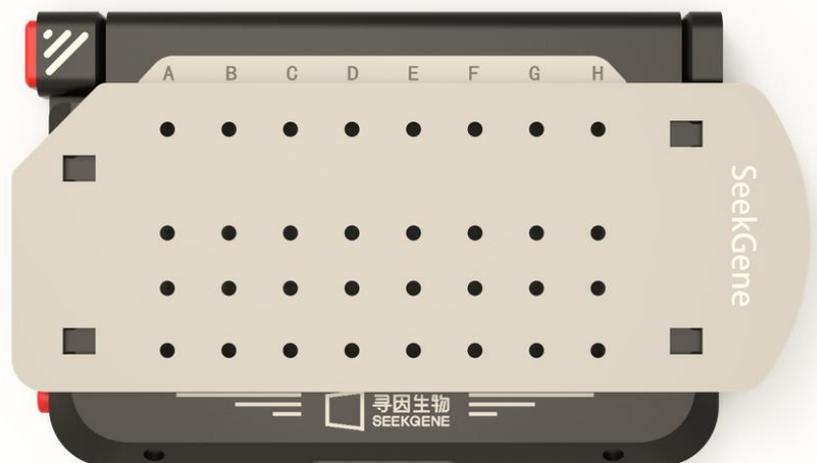
1. 取出对应样本数量的 Chip S3，替换芯片夹具中对应位置的 Chip P，然后将芯片夹具盖上（如下图所示）；



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 24H 内使用。

2. 将单细胞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 1-3 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“全序列”程序和“确认”按钮，启动程序；

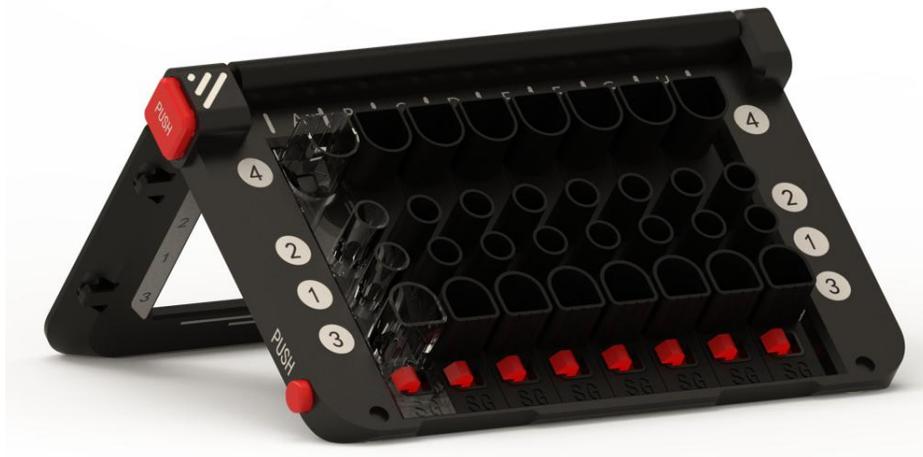


4. 程序运行结束后，点击“出仓”按钮，取出夹具。立即进行下一步实验。



Step 1-4 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 <math><10 \mu\text{L}</math>，2 号孔剩余应 <math><15 \mu\text{L}</math>，产物总体积约 120 $\mu\text{L}</math>。$
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 $\mu\text{L}</math> 的小量程枪头吸掉，注意不要带吸走生成的粉色油包水产物。
注 2：多芯片同时运行时，会小概率观察到个别芯片的标签 4 号对应的孔道中出现气泡，这属于正常现象，不会影响文库及后续结果。$
5. 观察吸头内的液体情况，正常液相呈均一不透明乳油状；



注：若出现左二管情况，说明存在堵塞。

- 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、震荡，转出的油包水立即进行逆转录反应。

Step 1-5 油包水逆转录反应

- 将 Step1-4 中装有油包水的 PCR 管，放入 PCR 仪中运行下列程序，PCR 热盖 85°C，体积 100 μ L；

循环	温度	时间	变温速率
15 cycle	8°C	12 s	
	15°C	45 s	1.5°C/s
	20°C	45 s	1.5°C/s
	30°C	30 s	1.5°C/s
	42°C	3 min	1.5°C/s
	85°C	5 min	
	4°C	Hold	

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逆转录反应，结束后离心合并成一管。

STOPPING POINT: 逆转录后的油包水可在 4°C 最多储存 72 h，或者 -20°C 最多储存 1 周。

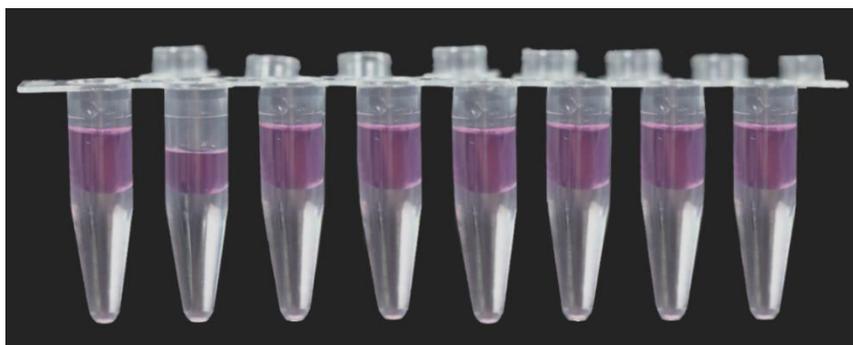
Step 2 样本回收和 cDNA 富集扩增

实验前准备

- 提前准备好冰盒；
- 提前将 2×PCR Master Mix、cDNA Primers、Blockers-HM、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 1.5 mL；
- 提前将 Cleanup Beads 和 DNA 分选磁珠平衡至室温备用。

Step 2-1 油包水破乳

- 室温下，向每管油包水液体中加入 100 μ L Demulsion Agent，室温静置 2 min；



注 1: 最后形成的混合液 (如上图所示) 包括 Demulsion Agent/Carrier Oil (透明) 和水相反应液 (粉红)。

注 2: 如果水相反应液过少, 可能芯片有堵塞 (如上图左二所示)。

2. 按照下表要求配制 Cleanup Mix:

组分	体积/样本
○ Cleanup Beads	175.5 μ L
● Reducing Buffer	4.5 μ L
Total	180 μ L

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, 防止吸到粉红色水相反应液;

注: 如果破油后步骤 1 仍出现雾状浑油上部水相反应液, 可以再次重复 1 和 3 步骤二次破油。

4. 向每管样本加入 180 μ L 振荡混匀后的 Cleanup Mix, 轻轻缓慢吹打至少 15 次, 开盖室温孵育 10 min;

注: 加液时混匀时移液器吸头尖随着液面上下移动, 防止液面太满撒漏污染。

5. 孵育结束后, 将 PCR 管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。

6. 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;

7. 闭盖瞬时离心, 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;

8. 开盖室温静置 1 min 干燥磁珠至呈暗哑色以使乙醇完全挥发, 加入 23 μ L Nuclease-free Water 充分悬浮磁珠, 室温静置 2 min;

注 1: 磁珠干燥至呈现暗哑色不干裂大约需要 1 min, 不超过 1.5 min。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。

9. 置于磁力架上吸附至溶液澄清, 转移上清 22 μ L 至新的 0.2 mL PCR 管中。

Step 2-2 cDNA 富集

1. 配制 cDNA 扩增 Mix:

组分	体积/样本
● 2 \times PCR Master Mix	25 μ L
● Blockers-HM	1.5 μ L
● cDNA Primers	2 μ L
Total	28.5 μ L

2. 将配制好的 28.5 μL cDNA 扩增 Mix 加入到 Step 2-1 步骤纯化后的 22 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 $^{\circ}\text{C}$ ，体积 50 μL ：

扩增循环数	温度	时间
7	98 $^{\circ}\text{C}$	3 min
	98 $^{\circ}\text{C}$	10 sec
	63 $^{\circ}\text{C}$	15 sec
	72 $^{\circ}\text{C}$	3 min
	72 $^{\circ}\text{C}$	5 min
	4 $^{\circ}\text{C}$	Hold

Step 2-3 cDNA 富集产物纯化

1. 吸取 30 μL (0.6 \times) 的 DNA 分选磁珠加入 Step 2-2 PCR 产物中，吹打 10 次混匀或振荡混匀；
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 后小心去除上清乙醇；重复此步骤一次；
4. 闭盖瞬时离心，用 10 μL 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. 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 23 μL Nuclease-free Water 充分悬浮磁珠，室温静置 2 min 后瞬离；
6. 置于磁力架上吸附至溶液澄清，转移上清 22 μL 至新的 0.2 mL PCR 管中。

注 1：0.6 \times 是指加入的 DNA 分选磁珠与 PCR 产物的体积比，即 30 μL / 50 μL =0.6 \times 。

注 2：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 2-4 cDNA 二次富集

1. 配制 cDNA 扩增 Mix：

组分	体积/样本
● 2 \times PCR Master Mix	25 μL
● Blockers-HM	1.5 μL
● cDNA Primers	2 μL
Total	28.5 μL

2. 将配制好的 28.5 μL cDNA 扩增 Mix 加入到 Step 2-3 步骤纯化后的 22 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 $^{\circ}\text{C}$ ，体积 50 μL ：

扩增循环数	温度	时间
6-7 (见下表)	98 $^{\circ}\text{C}$	3 min
	98 $^{\circ}\text{C}$	10 sec
	63 $^{\circ}\text{C}$	15 sec
	72 $^{\circ}\text{C}$	3 min
	72 $^{\circ}\text{C}$	5 min
	4 $^{\circ}\text{C}$	Hold

上样细胞数	推荐扩增循环数
500-12,000 个	7
12000-24,000 个	6

Step 2-5 cDNA 二次富集产物纯化

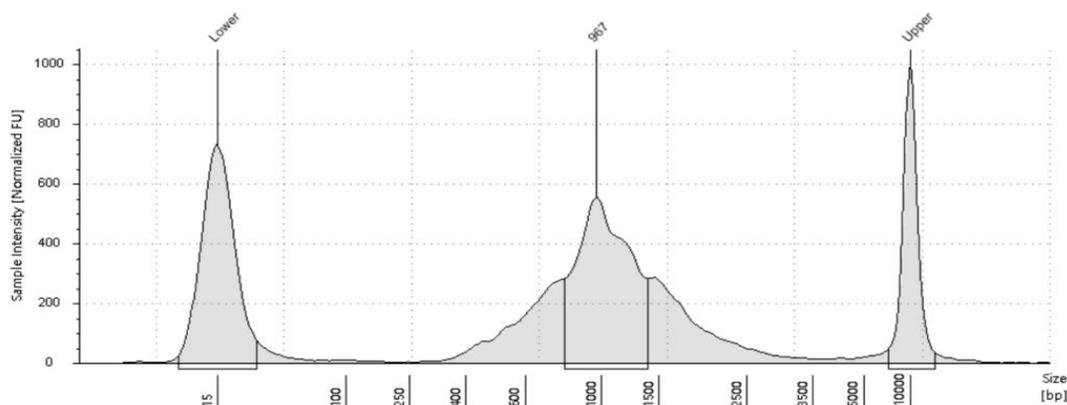
1. 吸取 30 μ L (0.6 \times) 的 DNA 分选磁珠加入 Step 2-4 PCR 产物中，吹打 10 次混匀或振荡混匀；
注：0.6 \times 是指加入的 DNA 分选磁珠与 PCR 产物的体积比，即 30 μ L / 50 μ L = 0.6 \times 。
2. 将混匀好的产物室温静置 5 min 后瞬离，置于磁力架上吸附至溶液澄清，去除上清；
注：吸附时使用移液器吸头朝吸附磁珠面的对侧轻吸混 5 次，加速磁力吸附。
3. 保持在磁力架上加入 200 μ L 80%乙醇，约 30 sec 后小心去除上清乙醇；重复此步骤一次；
4. 闭盖瞬时离心，用 10 μ L 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. 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 2 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 富集产物纯化后可在 -20 $^{\circ}$ C 下储存不超过 1 个月或 4 $^{\circ}$ C 储存不超过 72 h。

Step 2-6 cDNA 富集产物质检标准

1. 捕获 500-5,000 个细胞，cDNA 富集产物浓度 (Qubit) \geq 1 ng/ μ L，产物峰形片段范围在 250-5,000 bp，主峰在 750-2,500 bp 范围 (Agilent 4200 TapeStation)，判定合格；
2. 捕获 6,000-10,000 个细胞，cDNA 富集产物浓度 \geq 3 ng/ μ L，产物峰形片段范围在 250 -5,000 bp，主峰在 750-2,500 bp 范围，判定合格；
3. 0.5 ng/ μ L \leq cDNA 富集产物浓度 < 1 ng/ μ L，产物峰形片段范围在 250 -5,000 bp，主峰在 750-2,500 bp 范围，或 cDNA 富集产物浓度 \geq 1 ng/ μ L，检测峰图范围在 250 -5,000 bp，主峰不在 750-2,500 bp 范围，提示风险；
4. cDNA 富集产物浓度 < 0.5 ng/ μ L，或产物峰形检测在 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 0.6 \times 纯化，直至无小片段。



Step 3 文库构建

实验前准备

- 提前准备好冰盒；
- 提前将 Fragmentation Buffer、Ligation Buffer、Adaptor、2×PCR Master Mix 从-20℃取出冰上解冻，充分振荡后瞬时离心，置于冰盒上备用；
- 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 1.5 mL；
- 提前将 DNA 分选磁珠平衡至室温备用。

Step 3-1 DNA 片段化与末端修复

1. 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℃	Hold
2	32℃	2 min
3	65℃	30 min
4	4℃	Hold

2. 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 50-100 ng 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 15 μL 进行后续打断反应。

注：例如 cDNA 浓度 5 ng/μL，取 50ng 建库的模板体积 10 μL=50 ng/(5 ng/μL)。

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

3. 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；
4. 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 3-2 接头连接

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
● Ligation Buffer	20 μL
● DNA Ligase	5 μL
● Adaptor	5 μL
Nuclease-free Water	20 μL
Total	50 μL

2. 将 50 μL 反应体系加入到 Step 3-1 片段化产物中，用移液器吹打 15 次混匀，瞬时离心；
3. 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°C	15 min
2	4°C	Hold

Step 3-3 连接产物纯化

- 反应结束后瞬时离心，加入 60 μL DNA 分选磁珠 (0.6 \times)，用移液器吹打 10 次混匀或振荡混匀；
注：0.6 \times 是指加入的 DNA 分选磁珠与 PCR 产物的体积比，即 30 μL / 50 μL = 0.6 \times 。
- 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。
- 保持在磁力架上加入 200 μL 80%乙醇，约 30 sec 后小心去除上清乙醇；重复此步骤一次；
- 去除上清后，进行瞬时离心，用 10 μL 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；
- 室温静置 3-5 min 使乙醇完全挥发（磁珠呈现暗哑色，不干裂）；
- 加入 23.5 μL Nuclease-free Water 充分悬浮磁珠，室温静置 2 min 后瞬离；
- 置于磁力架上吸附至溶液澄清，转移上清 23 μL 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 3-4 文库扩增

- 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
● N7	1 μL
Total	27 μL

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 μL 添加到扩增体系中，产品货号 K02001-96。

- 取 27 μL 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；
- 按照下列条件设置 PCR 程序，进行反应，热盖 105°C，体积 50 μL 。

扩增循环数	温度	时间
11-16 (见下表)	98°C	3 min
	98°C	20 sec
	54°C	30 sec
	72°C	20 sec
	72°C	5 min
	4°C	Hold

cDNA 投入量	推荐扩增循环数
cDNA \leq 10 ng	16
10 ng < cDNA \leq 25 ng	14
25 ng < cDNA \leq 50 ng	13
50 ng < cDNA \leq 75 ng	12

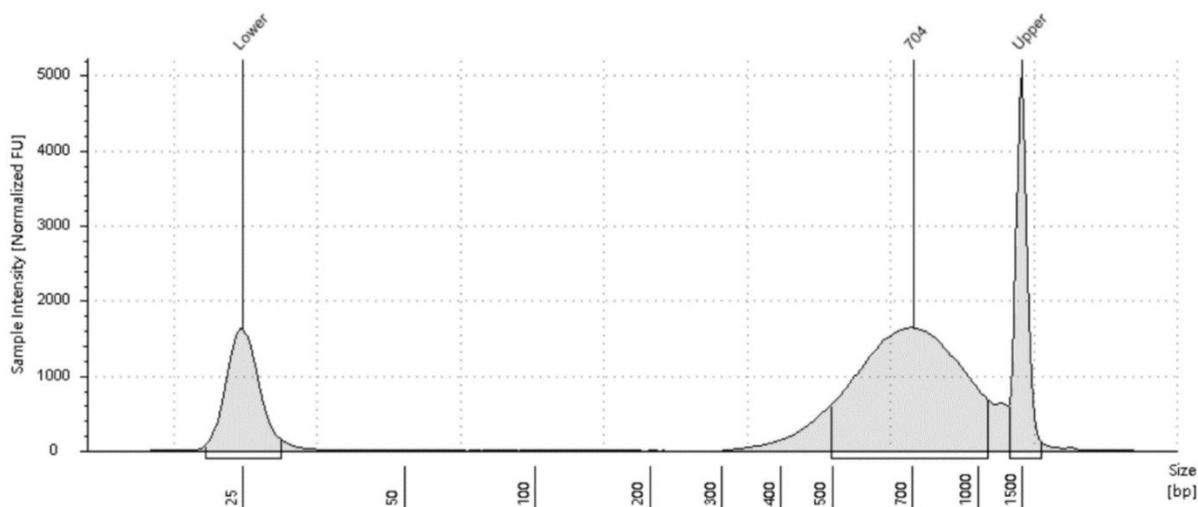
Step 3-5 文库纯化

1. 反应结束后瞬时离心，加入 26 μL DNA 分选磁珠 (0.52×)，用移液器吹打 10 次混匀或振荡混匀；
注：0.52×是指加入的 DNA 分选磁珠与 PCR 产物的体积比，即 26 μL / 50 μL=0.52×。
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 μL 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 μL 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干裂）；
6. 加入 31 μL 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 μL 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 1: 文库产物分选后可在-20℃下储存不超过 6 个月。

Step 3-6 文库质控标准

1. 文库浓度(Qubit)≥5 ng/μL 无小片段污染，主峰在 400-900 bp 范围（Agilent 4200 TapeStation），判定合格；
2. 1 ng/μL≤文库浓度<5 ng/μL，主峰在 400-900 bp 范围，无小片段污染，可风险上机；
3. 文库浓度≥ 5 ng/μL，产物峰形片段范围在 400-900 bp，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/μL，或产物峰形检测在 400-900 bp 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 0.6×纯化，直至无小片段。



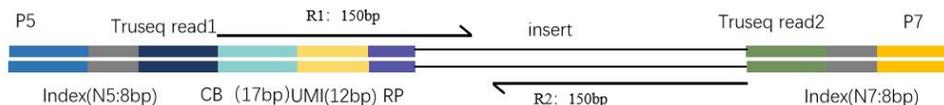
注：后续若匹配杂交捕获流程，文库总量不满足于捕获用量要求时，可取 1/4-1/3 体积的纯化后文库进行扩增，客户可根据捕获所需文库用量及所用扩增酶说明书自行设定扩增循环数；
扩增酶：需使用高保真扩增酶，推荐 KAPA HiFi HotStart ReadyMix PCR Kit (KK2602)；
扩增引物：客户可自行设计或使用推荐引物，引物序列如下：

P5: AATGATACGGCGACCACCGA

P7: CAAGCAGAAGACGGCATAACGA

附录 1：高通量测序

1. 测序文库: SeekOne® DD 单细胞全序列转录组以 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。



2. 测序平台: 此试剂盒构建的单细胞文库可适配于 Illumina 测序平台。

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

3. 文库测序深度及运行参数:

测序深度	≥20,000 reads/cell 建议 50,000 reads/cell
测序类型	双端测序
测序读长	Read1: 150 bp N7 Index: 8 bp N5 Index: 8 bp Read2: 150 bp

注 1: 建议测序量: ≥50,000 reads/cell, 以确保单细胞测序数据分析的准确性。

注 2: 建议测序读长: 双端测序, 其中 Read1 端读长 150 bp; Read2 端读长 150 bp。

4. 文库上样量

平台	仪器	上样浓度 (pM)	PhiX (%)
Illumina 平台	MiSeq	11	1
	NextSeq 500/550	1.8	1
	NextSeq1000/2000	650	1
	HiSeq 2500(RR)	11	1
	HiSeq 4000	240	1
	NovaSeq	150*/300	1

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

其他测序平台信息请联系 (support@seekgene.com) 以获得进一步帮助。

5. 文库 pooling

考虑到基因表达文库可能会被 pooling 到一条 lane 进行测序, 同时上样测序的文库中不能使用相同 index, 相同 index 的样本不能在后续分析中进行样本间数据的拆分。

附录 2：生物信息学分析

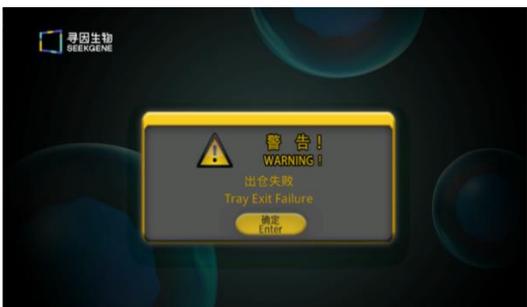
1. 分析软件：单细胞数据分析采用北京寻因生物自主研发的 SeekSoul Tools；SeekSoul Tools 可识别 Cell Barcode，比对定量，得到下游分析的细胞表达矩阵，用于后续的细胞聚类 and 差异分析。
 - 1) 输入文件：FASTQ (clean data)
 - 2) 输出文件：bam,html, csv,matrix(filtered_feature_bc_matrix,raw_feature_bc_matrix)
 - 3) 操作系统：Linux
2. 软件获得：点击 <http://seeksoul.seekgene.com/index.html> 可获得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》。

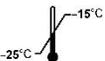
附录 4：SeekOne® 数字液滴仪故障处理

设备在运行过程中，可能会出现问題。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
 <p>警告！ WARNING! 控制器通讯故障 Controller Communication Failure 确定 Enter</p>	<p>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題，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。</p>
 <p>警告！ WARNING! 出仓失败 Tray Exit Failure 确定 Enter</p>	<p>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。</p>
 <p>警告！ WARNING! 进仓失败 Tray Entry Failure 确定 Enter</p>	<p>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。</p>

	<p>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。</p>
	<p>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。</p>
	<p>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。</p>
	<p>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。</p>
	<p>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。</p>

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
	应避免雨淋		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	生效日期
1	新建	2022. 02. 21
2	修订	2022. 07. 21
3	修订	2024. 01. 01
4	修订	2024. 04. 01
5	修订	2024. 06. 14