

SeekOne® MM 大孔径高通量单细胞转录组试剂盒使用说明书 V1.1

K00301-0401 & K00301-0402

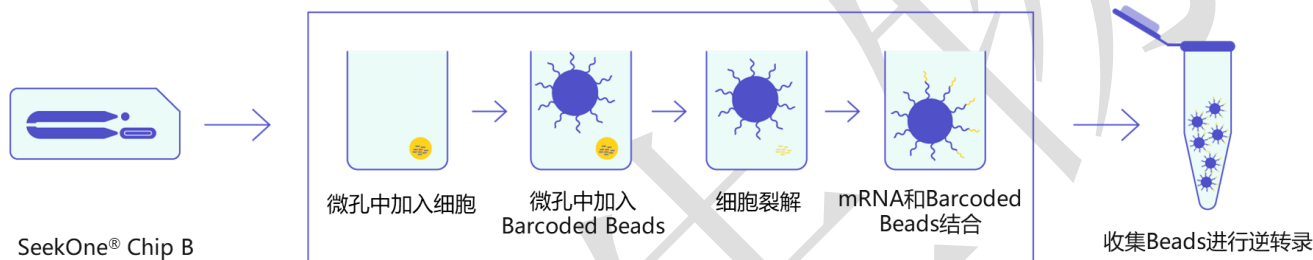
产品简介

SeekOne® MM (Microwell & Magnetic Beads)大孔径高通量单细胞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高通量单细胞转录组建库试剂盒。该试剂盒无需配备仪器，即可完成从单细胞捕获到转录组文库构建全过程，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。

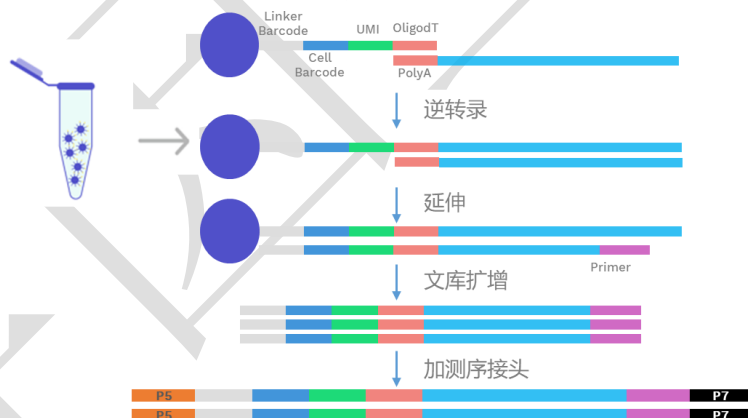
SeekOne® MM 大孔径单细胞转录组试剂盒包括微孔芯片（SeekOne® Chip B）、分子标签磁珠（Barcoded beads）、扩增试剂、文库构建试剂以及单细胞数据分析软件（SeekSoul Tools）。该试剂盒基于微孔技术原理，通过 SeekOne® Chip B 实现单细胞捕获，并利用核酸修饰的 Beads 对不同细胞来源的 RNA 进行分子标记，最终构建兼容 Illumina 和华大智造测序仪的高通量单细胞转录组文库，可用于肿瘤、免疫、细胞发育、病毒感染、用药指导及靶标筛选等研究。

实验原理和流程概要

● SeekOne® Chip B 单细胞捕获与标记流程



● 文库构建流程



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适当的细胞过滤器过滤细胞悬浮液；
- 适用球形细胞 10-70μm，长条形细胞<100μm。

2. 样本质量要求

- 单张芯片最低投入细胞数不少于 1,000 个；
- 细胞活性：活细胞率>90%分析效果最佳；>80%亦可进行分析（台盼蓝染色后利用显微镜以及血细胞计数板进行计数）。

3. 样本储存要求：新鲜单细胞悬液，冰上放置，6 小时内完成单细胞裂解和标记实验效果最佳。

注：实验开始前，需利用显微镜以及血细胞计数板对单细胞悬液进行细胞计数以及活细胞率计算。

上样量建议

计算并吸取需要的单细胞母液体积 V，加入 1×PBS 至总体积 550 μL 得到上样单细胞悬液，单细胞母液体积 (V) = N×2/C。

V：单细胞样本母液体积；N：目标细胞数；C：单细胞母液浓度

产品组分及保存条件

SeekOne® MM 大孔径高通量单细胞转录组试剂盒按照试剂储存条件分为：**模块一**（4℃）、**模块二**（-20℃）。

货号	K00301-0401 & K00301-0402		
规格	4 tests		
组分	体积	数量	储存条件
SeekOne Chip B**	-	4 张	4℃
Chip Buffer A	3mL	1 瓶	4℃
CBBS-B	0.85 mL	1 管	4℃
Lysis Buffer	20mL	1 瓶	4℃
Wash Buffer A	5 mL	1 瓶	4℃
Wash Buffer B	10 mL	1 瓶	4℃
TBuffer	4 mL	1 瓶	4℃
Enzyme A-T	90 µL	1 管	-20℃
Enzyme B	50 µL	1 管	-20℃
Enzyme E	45 µL	1 管	-20℃
0.1 M DTT	1.2mL	1 瓶	-20℃
Buffer A-T	200 µL	1 管	-20℃
Buffer B	100 µL	1 管	-20℃
Buffer C	250 µL	1 管	-20℃
Buffer D	700 µL	1 管	-20℃
25mM dNTP	40 µL	1 管	-20℃
I501	25 µL	1 管	-20℃
I502	25 µL	1 管	-20℃
I503	25 µL	1 管	-20℃
I701	25 µL	1 管	-20℃
I702	25 µL	1 管	-20℃
I703	25 µL	1 管	-20℃
Nuclease-free Water	5mL	1 瓶	4℃
2×PCR Master Mix	420 µL	1 管	-20℃
Universal Oligo	30 µL	1 管	-20℃

Index 序列**

Index 号	正向序列
I501	ACTAGAGC
I502	TGCCTATA
I503	GCAGCTGT
I701	TCAAGTAT
I702	CACTTCGA
I703	GCCAAGAC

注 1: CBBS-B: Cell Barcode Beads;

注 2: 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，i5 Index 需提供反向互补序列；

注 3: 文库的接头序列如下：

I5	5'AATGATACGGCGACCGAGATCTACAC[I5]ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT 3'
I7	5'CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT[I7]GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATC 3'

试剂盒参数说明

1. SeekOne Chip B: 本试剂盒的微孔芯片（SeekOne Chip B）如下图所示，包含进样口和出样口：其中进样口用于注入单细胞悬液以及各步骤所需试剂，出样口用于收集（出样口对准收集管）和丢弃（出样口对准废液收集瓶）各步骤的实验成分。该芯片与 SeekOne Chip Holder 以及收集管和废液收集瓶配套使用。



- SeekOne Chip B 的腔室容积：550 µL；
- 微孔数目：3.2 万，可捕获 500-3,000 个细胞；
- 微孔直径：130 µm，适用于直径 20-70 µm 的细胞。

2. Index 序列：本试剂盒提供的 Index 序列可同时标记 9 个样品。

配套使用的仪器

SeekOne Chip Holder: 芯片夹具，与 SeekOne Chip B 配套使用。

需自备的仪器和其他试剂

1. 自备仪器以及耗材

细胞计数设备（血细胞计数板或者细胞计数仪）、显微镜、1.5 mL 磁力架（推荐 DynaMag™-2 Magnet，货号 12321D），0.2 mL 磁力

架（推荐 DynaMag™-PCR Magnet，货号 492025）、移液器（2.5 μL、20 μL、200 μL、1,000 μL）、可编程降温恒温混匀仪（1 台，杭州瑞诚 TCS10）、普通 PCR 仪、Qubit、核酸片段分析仪（Agilent 4200 TapeStation 系统或者 Agilent 2100 Bioanalyzer 等）、离心机、0.2 mL/1.5 mL RNase-free 低吸附 EP 管以及低吸附枪头等。

2. 自备试剂/试剂盒

试剂名称	体积
1×PBS	500 mL
无水乙醇（分析纯）	500 mL
DNA 分选磁珠 (AmPure® XP magnetic 或者 VAHTD DNA clean beads)	5 mL
台盼蓝	10 μL
Qubit dsDNA HS Assay Kit (Qubit 4.0 配套试剂)	-
片段分析仪配套试剂 (Agilent 4200 TapeStation 配套试剂等)	-

实验操作步骤

Step 1 单细胞 RNA 捕获

实验前准备

- 提前准备好冰盒；
- 将提前准备好符合要求的 550 μL 的上样单细胞悬液，冰上放置；
- Wash Buffer A、Wash Buffer B 置于冰上备用；
- 取 5 mL Lysis Buffer 并加入 250 μL 0.1 M DTT 后，震荡混匀，置于冰上备用，加入 DTT 后的 Lysis Buffer 请在 24 小时内使用；
- 芯片中应一直充满液体。

Step 1-1 SeekOne Chip B 预处理

1. 将 SeekOne Chip Holder 按照其说明书组装完成后备用；
2. 小心从包装袋中取出 SeekOne Chip B，置于 SeekOne Chip Holder 中，注意不要触碰到加样孔；
注：从 Step1-1 的步骤 2 至 Step 1-2 的步骤 11，SeekOne Chip B 一直置于 SeekOne Chip Holder 上。
3. 将 15 mL 废液收集瓶和 1.5 mL 磁珠收集管分别置于 SeekOne Chip Holder 中，其中废液收集瓶置于芯片出样孔下方；
4. 通过 SeekOne Chip B 的加样孔缓慢（10-15 sec）加入 600 μL 的无水乙醇，使溶液布满整个腔室；
5. 缓慢（约 15 sec）的向 SeekOne Chip B 注入 600 μL 空气以去除腔室中的无水乙醇，然后静置 3min；
6. 重复 4-5 两次；
7. 立即缓慢（10-15 sec）向 SeekOne Chip 中加入 600 μL 1×PBS，然后注入 600 μL 空气以去除腔室中的 1×PBS，重复此步骤一次；
8. 然后向 SeekOne Chip 中加入 600 μL Chip Buffer A，室温孵育 15 min；
9. 向 SeekOne Chip B 中注入 600 μL 空气以去除腔室中的液体，然后立即缓慢（10-15 sec）加入 600 μL 1×PBS，室温放置备用。

Step 1-2 单细胞上样及裂解

1. 向预处理好的 SeekOne Chip B 中注入 600 μL 空气以去除腔室中的 1×PBS，用移液枪缓慢吹打混匀单细胞悬液 5 次，然后缓慢加入 550 μL 吹打混匀好的单细胞悬液到 SeekOne Chip B 中，室温静置 10min（可选，在 10×物镜下镜检观察细胞落孔情况）；
2. 用移液器缓慢吹打混匀 CBBS-B 后，吸取 200 μL CBBS-B 加入新的 1.5 mL EP 管中；
3. 然后向吸出的 CBBS-B 的管中加入 1 mL 1×PBS 缓慢吹打混匀后，放于磁力架上吸附至溶液澄清，小心去除上清，切勿吸到 CBBS-B；重复此步骤一次；
4. 去除上清后补加 1×PBS 到 550 μL，冰上备用；
5. 向 SeekOne Chip B 中注入 600 μL 空气以去除腔室中的 1×PBS，然后将 600 μL 吹打混匀的 CBBS-B 缓慢（10-15 sec）的加入到 SeekOne Chip B 中，静置 3 min；
6. 将 SeekOne Magnet 从 SeekOne Chip B 下方插入 SeekOne Chip Holder 中（到步骤 9，SeekOne Magnet 一直在 SeekOne Chip B 下方），静置 30s；
7. 从 SeekOne Chip B 进样口中缓慢（15 sec-20 sec）注入 600 μL 空气以冲洗腔室中的未落孔磁珠，然后立即缓慢（10-15 sec）加入 600 μL 1×PBS；

注 1：此时芯片中应充满 1×PBS 溶液；

注 2：（可选）在 10×物镜下镜检：在镜下随机选取非加样孔周边区域的 3 个视野，该 3 个视野的磁珠落孔率应≥95%；

注 3: (重要) 在 10×物镜下镜检, 如果未落孔的 CBBS-B>5%, 则重复 7 一次。

8. 向 SeekOne Chip B 中缓慢 (10-15 sec) 注入 600 μ L 空气后立即加入 600 μ L 预冷的 Lysis Buffer (确认是否加入 DTT), 室温孵育 2 min 以充分裂解细胞;
9. 向 SeekOne Chip B 中缓慢 (10-15 sec) 注入 600 μ L 空气以去除腔室中的裂解后的细胞碎片, 然后立即缓慢 (10-15 sec) 加入 600 μ L 预冷的 Lysis Buffer;
10. 抽出 SeekOne Magnet, **水平旋转** SeekOne Chip Holder 的底座部分 180°, **将出样孔对准 1.5 mL 磁珠收集管**;
11. 将 SeekOne Magnet 倒置于桌面 (如下左图所示), 将 SeekOne Chip B 倒置于 SeekOne Magnet 上部, 吸附 2 min (如下中图所示), 然后再倒置回正面迅速放在 SeekOne Chip Holder 上 (如下右图所示);



12. 向 SeekOne Chip B 中快速注入 700 μ L 预冷的 Lysis buffer (注入 Lysis buffer 时间不大于 2 sec), 以将腔室中结合 RNA 的 CBBS-B 冲洗到 1.5 mL 磁珠收集管中; 重复本步骤一次, 此时磁珠收集管中应有 1.4 mL 含有磁珠的 Lysis buffer;
13. 从 SeekOne Chip Holder 中取出磁珠收集管放到磁力架上直至澄清; 丢弃上清 (请勿吸到 CBBS-B), 立即缓慢地加入 1,000 μ L 预冷的 Wash Buffer A;
14. 将 EP 管从磁力架中取出, 轻轻缓慢地吹打至 CBBS-B 均匀散开 (只在此步骤吹散), 然后再置于磁力架上吸附, 直至溶液澄清; 去除上清, 随后缓慢地加入 1,000 μ L 预冷的 Wash Buffer B;
15. 直至溶液澄清, 静置 30 sec 后, 去除上清, 并立即缓慢地加入 1,000 μ L 预冷的 Wash Buffer B, 冰上放置备用, 放置时间不超过 10 min。

Step 2 逆转录

实验前准备

- 提前拿出 Buffer A-T 与 Buffer B, 室温放置至完全溶解后置于冰上备用;
- 25mM dNTP、Enzyme A-T 短暂离心后放置在冰上备用。

1. 配制逆转录反应体系 (逆转录一定要先按下表配制成反应 Mix 后再使用):

组分	体积/样本
Buffer A-T	40 μ L
25mM dNTP	8 μ L
0.1M DTT	10 μ L
Enzyme A-T	20 μ L
Nuclease-free Water	122 μ L
Total	200 μ L

2. 将 Step1-2 中步骤 15 制备的 CBBS-B 溶液放于磁力架上直至溶液澄清, 去除上清后立即缓慢加入配制好的逆转录反应体系;
3. 按下列条件设置恒温混匀仪, 进行逆转录反应: 37°C, 1,500 rpm, 20 min;
4. 逆转录反应结束后, 立即将 EP 管放于冰上备用。

STOPPING POINT: 逆转录反应产物可在 4°C 下储存不超过 6 小时。

5. 配制反应体系:

组分	体积/样本
Buffer B	20 μ L
Enzyme B	10 μ L
Nuclease-free Water	170 μ L
Total	200 μ L

6. 将 Step 2 中步骤 4 的 CBBS-B 溶液放于磁力架上直至溶液澄清, 去除上清后立即缓慢加入配制好的反应体系, 放入恒温仪;
7. 按下列条件设置恒温混匀仪, 进行反应:
 - 37°C, 1,500 rpm, 60 min;
 - 85°C, 15 min (不旋转);
8. 恒温仪反应结束后 (小心烫伤), 将 EP 管放置到室温 3 min, 瞬离后放于磁力架上吸附直至溶液澄清;
9. 去除上清, 加入 200 μ L 的 TBuffer 重悬, 冰上备用。

STOPPING POINT: 反应产物可在 4℃下储存不超过 3 个月。

Step 3 转录组建库

实验前准备:

- 提前取出 Buffer C、Buffer D、放置室温融化后与 Enzyme E 一起置在冰上备用;
- 提前设置恒温混匀仪 1 程序如下: 95℃, 5 min (不旋转); 37℃, 1,500 rpm, 5 min; 25℃, 1,500 rpm, 15 min; 可先升温至 95℃备用;
- 配备 10 mL 的 80%乙醇 (现用现配, 放置时间小于 24 小时);
- 提前将 DNA 分选磁珠平衡至室温。

Step 3-1 杂交延伸

1. CBBS-B 短暂离心后立即放到磁力架上去除上清;
2. 向 CBBS-B 中加入 50 μ L 的 Buffer C, 轻轻缓慢吹打 (避免产生气泡) 10 次后, 立即放入已升温至 95℃的恒温混匀仪中开始反应:

95℃, 5 min
37℃, 1,500 rpm, 5 min
25℃, 1,500 rpm, 15 min

待反应结束后短暂离心, 放置于室温;

3. 取一新的 PCR 管, 按照配制表将进行反应 Mix 配制:

组分	体积/样本
Buffer D	141 μ L
Enzyme E	9 μ L
Total	150 μ L

4. 将配制好的 Mix 加入到步骤 3 的产物中, 于恒温混匀仪上进行反应, 设置如下:

37℃, 1,500 rpm, 10 min
53℃, 1,500 rpm, 30 min

5. 待步骤 5 反应结束后, 立即将样本放于磁力架上吸附至溶液澄清;
6. 丢弃上清, 加入 200 μ L 的 TBuffer 重悬, 将样本转移到 250 μ L PCR 管中, 放于磁力架上至溶液澄清, 重复此步骤一次;
7. 提前设置恒温混匀仪程序如下: 95℃, 5 min (不旋转); 95℃, 1,500 rpm, 10 sec; 先升温至 95℃备用;
8. 去除步骤 7 的上清, 加入 82 μ L 的 TBuffer 重悬后, 立即放于恒温混匀仪, 结束后立即置于磁力架上至溶液澄清后, 迅速转移全部上清 (约 80 μ L) 至一新的 250 μ L PCR 管中, 作为收集管。

注: 不要吸到 CBBS-B; 如果残留溶液过多, 瞬离后用 10 μ L 移液器将所残留的溶液转移到相应的收集管中。

Step 3-2 延伸产物纯化

1. 吸取 144 μ L (1.8 $\times$) 的 DNA 分选磁珠加入该上清中, 吹打 10 次混匀;
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;
3. 保持在磁力架上加入 200 μ L 80%乙醇, 转动 PCR 管, 使磁珠与 80%乙醇充分接触, 约 30 sec 后小心去除上清; 重复此步骤一次;
4. 去除上清后, 进行瞬离, 用 20 μ L 移液器去除所有残留的上清;
5. 室温静置使乙醇完全挥发 (磁珠呈现暗哑色, 约 5-10 min), 加入 55.2 μ L Nuclease-free Water 充分悬浮磁珠, 室温静置 2 min;
6. 然后置于磁力架上吸附至溶液澄清, 转移上清 (55 μ L) 至新的 200 μ L PCR 管中。

STOPPING POINT: 纯化产物在 PCR 之前, 置于冰上或者 4℃不超过 24 小时。

Step 3-3 PCR 富集杂交产物

1. 按照配制图, 用新的 PCR 管配制新的 MIX 反应制剂:

组分	体积/样本
2 $\times$ PCR Master Mix	60 μ L
Universal Oligo	5 μ L
Total	65 μ L

2. 将配制好的 65 μ L PCR Mix 中加入到 **Step 3-2 步骤**纯化后的 55 μ L PCR 产物中, 吹打混匀 10 次, 每份均分两管, 然后进行 PCR。设置 PCR 程序如下:

扩增循环数	温度	时间
10-12 (见下表)	98°C	3 min
	98°C	30 sec
	63°C	1 min
	72°C	1 min
	72°C	5 min
	4°C	Hold

细胞直径	上样细胞数	推荐扩增循环数
≤50μm	1000-3,000 个	12
	3,000-6,000 个	11
>50 μm	1000-3,000 个	11
	3,000-6,000 个	10

Step 3-4 PCR 富集产物纯化

1. 瞬离 PCR 产物，转移两管 PCR 产物到同一新的 200 μL PCR 管中，加入 120 μL DNA 分选磁珠（1×），并用移液器吹打 10 次混匀；
2. 将混匀好的 PCR 产物室温静置 2 min 后，放置于磁力架吸附至溶液澄清，去除上清；
3. **（重要）**加入 50 μL Nuclease-free Water 充分悬浮磁珠，室温静置 1 min；
4. **（重要）**新吸取 50 μL 的 DNA 分选磁珠加入 PCR 管中，并用移液器吹打 10 次混匀；
5. 将混匀好的产物室温静置 2 min 后，置于磁力架上吸附至溶液澄清，去除上清；
6. 加入 200 μL 80%乙醇（保持放置在磁力架上），转动 PCR 管，使磁珠与 80%乙醇充分接触，约 30 sec 后小心去除上清，重复此步骤一次；
7. 将 PCR 管进行瞬离，用移液器（20 μL）去除所有残留的上清；
8. 室温静置 3-5 min 使乙醇完全挥发（磁珠呈现暗哑色）；
9. 加入 45 μL Nuclease-free Water 充分悬浮磁珠，室温静置 2 min；
10. 置于磁力架上吸附至溶液澄清，转移上清至新的 PCR 管中；
11. 质控：浓度一般介于 0.1-10 ng/μL 之间（Qubit 测量），若浓度 ≥1.0 ng/μL，应将浓度稀释至 1.0 ng/μL 后作为 Index PCR 的模板。

STOPPING POINT: PCR 富集产物纯化后可在 -20°C 下储存不超过 6 个月或 4°C 不超过 6 周。

Step 3-5 Index PCR

配制文库扩增 Mix

组分	体积/样本
2×PCR Master Mix	25 μL
I5	5 μL
I7	5 μL
Nuclease-free Water	10 μL
Total	45 μL

取 5 μL PCR 富集产物到配制好的文库扩增 Mix 中，吹打混匀 10 次，然后进行 PCR。

1. 文库构建 PCR 设置如下：

扩增循环数	温度	时间
▲8/10	98°C	45 sec
	98°C	20 sec
	63°C	30 sec
	72°C	30 sec
	72°C	5 min
	4°C	Hold

▲PCR 富集产物的浓度 >0.3ng/μL，PCR 选 8 cycles；浓度 ≤0.3 ng/μL 则选 10 cycles。

Step 3-6 Index PCR 产物分选

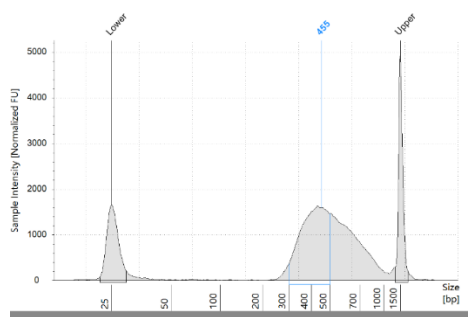
1. 离心 PCR 产物，加入 25 μL DNA 分选磁珠（0.5×），用移液器吹打 10 次混匀；
2. 室温静置 2 min 后，放置于磁力架上吸附至溶液澄清，吸取上清到另一含有 12.5 μL DNA 分选磁珠（0.25×）的 PCR 管中；用移液器吹打 10 次混匀；
3. 将混匀好的产物室温静置 2 min 后，放置于磁力架吸附至溶液澄清，去除上清；

4. 加入 200 μ L 80%乙醇（保持放置在磁力架上），转动 PCR 管，使磁珠与 80%乙醇充分接触，约 30 sec 后小心去除上清，重复此步骤一次；
5. 将 PCR管进行瞬离，用移液器（20 μ L）去除所有残留的上清；
6. 室温静置 3-5 min 使乙醇完全挥发（磁珠呈现暗哑色）；
7. 加入 30 μ L Nuclease-free Water 充分悬浮磁珠，室温静置 2 min；
8. 置于磁力架上吸附至溶液澄清并转移上清至新的 PCR 管中。

STOPPING POINT: Index PCR 文库产物分选后可在 -20°C 下在测序前储存不超过 6 个月。

Step 3-7 文库质控

1. 合格文库主峰片段大小介于 350-750 bp 之间，无小片段。如果有小片段再进行一次 0.75 $\times$ 纯化，直至无小片段（Agilent 4200 TapeStation）；



2. 文库浓度不低于 1.0 ng/ μ L（Qubit 4.0 测量）。

高通量测序

1. 测序平台：此试剂盒构建的单细胞文库可适配于 Illumina HiSeq XTen、华大 MGISEQ-2000 或者 Novaseq 等测序平台；
2. 平衡文库的添加：最终获得的测序文库上机测序时，建议添加 15%左右的平衡文库；
3. 建议测序量： $\geq 50,000$ reads/cell，以确保单细胞测序数据分析的准确性。

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；
2. 软件获得：[发送邮件至 tools@seekgene.com](mailto:tools@seekgene.com) 可获得该软件包及安装说明。

常见问题及解决方案

请扫描下方二维码获得常见问题及解决方案。

