

SeekOne® DD FFPE 样本单细胞转录组试剂盒 操作说明书

V1.0

K00202-0201& K00801-0202& K00801-0203& K02101-0204& K00202-0205& K02101-0206& K02101-0207
K00202-0801& K00801-0802& K00801-0803& K02101-0804& K00202-0805& K02101-0806& K02101-0807

Envision the Future
预见未来

北京寻因生物科技有限公司

目录

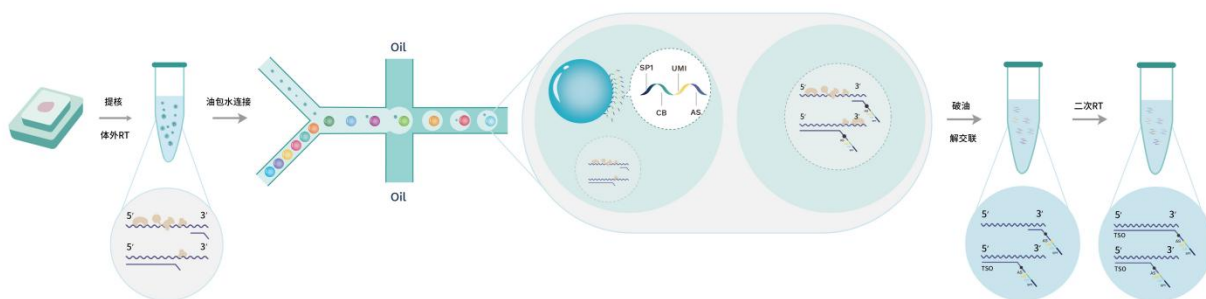
产品简介	2
实验原理	2
样本要求	3
1. 样本类型要求	3
2. 样本质量要求	3
3. 样本储存要求	3
上样量建议	3
产品组分及保存条件	3
保存条件	6
Index 序列	6
参数说明	6
配套使用的仪器和耗材	7
需自备的仪器和试剂	8
1. 自备仪器及耗材	8
2. 自备试剂/试剂盒	8
实验操作步骤	9
Step 1 体外逆转录反应	9
Step 2 油包水生成及 Barcode 标记	10
Step 2-1 准备单细胞混合液	10
Step 2-2 向 Chip S3 加入试剂	11
Step 2-3 运行 SeekOne® DD	12
Step 2-4 转移生成的油包水	13
Step 2-5 油包水连接反应	13
Step 3 解交联和纯化	14
Step 3-1 油包水破乳	14
Step 3-2 解交联	14
Step 3-3 纯化	14
Step 4 二次逆转录反应	15
Step 5 二次逆转录产物纯化	16
Step 6 cDNA 富集与纯化	16
Step 6-1 cDNA 富集	16
Step 6-2 cDNA 富集产物纯化	16
Step 6-3 cDNA 富集产物质检标准	17
Step 7 文库扩增与纯化	17
Step 7-1 文库扩增	17
Step 7-2 文库纯化	18
Step 7-3 文库质控标准	18
附录 1: 高通量测序	20
附录 2: 生物信息学分析	21
附录 3: SeekOne® 数字液滴仪使用说明	22
附录 4: SeekOne® 数字液滴仪故障处理	22
附录 5: 包装符号释义	24
附录 6: 修订历史	25

产品简介

SeekOne® DD FFPE 样本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 FFPE 样本的高通量单细胞转录组试剂盒。该试剂盒需配合本公司自主研发的 SeekOne® Digital Droplet System (SeekOne® 数字液滴仪, 简称 SeekOne® DD) 完成从单细胞核酸标记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 FFPE 样本单细胞转录组解决方案。

SeekOne® DD FFPE 样本单细胞转录组试剂盒包括: 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)、逆转录试剂、油包水标签连接试剂、解交联试剂、文库扩增试剂以及单细胞数据分析软件 (SeekSoul Tools)。本试剂盒先使用 oligo-dT 和随机引物抓取 FFPE 样本细胞核中不同降解程度的 coding 和 noncoding RNA, 再通过油包水实现单细胞分离, 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, 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、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

□单细胞核悬液：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 $\leq$ 2%，BSA $\leq$ 0.1%。

□直径：5-40 μm 。

2. 样本质量要求

□RNA 完整性：DV200 $>$ 40%，主峰 $>$ 200 bp（4150/4200 检测）；

□RNA 含量：2 万细胞核 Total RNA $>$ 25 ng（Qubit 检测）；

□细胞核数量：预处理后细胞核总量 $>$ 5 万，最低不少于 5 千；

□结团率 $<$ 25%，有核率 $>$ 10%。

3. 样本储存要求

冰上放置，30 min 内完成体外转录实验效果最佳。时间超过建议使用 1 mL 的 Wash Buffer 清洗一次，1 $\times$ PBS-RI 重悬。

注：实验开始前，需利用细胞计数仪对单细胞核悬液进行细胞计数。

上样量建议

□体外逆转录上样细胞核数建议 5 万-10 万：最低投入不少于 5 千，最高投入不超过 10 万；

□油包水连接上样细胞核数不超过 2.4 万。

产品组分及保存条件

SeekOne[®] DD FFPE 样本单细胞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 单细胞油包水连接试剂盒、SeekOne[®] DD 单细胞解交联试剂盒、SeekOne[®] DD 单细胞全序列逆转录试剂盒和 SeekOne[®] DD 单细胞文库扩增试剂盒。

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 单细胞全序列微珠试剂盒 V1.2 K00801-0202	1	○	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	2	●	3×RT Buffer	R0008401	80 µL
		●	RT Enzyme	R0003801	15 µL
		●	Reducing Buffer	R0003901	100 µL
SeekOne® DD 单细胞油包水连接试剂盒 V1.0 K02101-0204	1	●	DNA Ligase Mix	R0011801	15 µL
		●	RNase Inhibitor	R0011901	25 µL
		●	Primer R	R0012001	10 µL
		●	FFPE RT primers	R0012101	10 µL
		○	10×Ligation Buffer	R0012201	100 µL
SeekOne® DD 单细胞解交联试剂盒 V1.0 K02101-0206	1	●	DCL Buffer	R0012301	0.5 mL
		●	Enzyme K1	R0012401	90 µL
		●	Buffer S	R0012501	0.5 mL
		●	Buffer T	R0012601	0.5 mL
SeekOne® DD 单细胞文库扩增试剂盒 V1.0 K02101-0207	1	●	2×PCR Master Mix	R0002102	240 µL
		●	Pre-Primers	R0012701	10 µL
		●	Post-Primers	R0012801	10 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	2	○	Cleanup Beads	R0003401	0.5 mL

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 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	1	○	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	2	●	3×RT Buffer	R0008402	280 µL
		●	RT Enzyme	R0003802	50 µL
		●	Reducing Buffer	R0003901	100 µL
SeekOne® DD 单细胞油包水连接试剂盒 V1.0 K02101-0804	1	●	DNA Ligase Mix	R0011802	50 µL
		●	RNase Inhibitor	R0011902	100 µL
		●	Primer R	R0012002	30 µL
		●	FFPE RT Primers	R0012102	30 µL
		○	10×Ligation Buffer	R0012201	100 µL
SeekOne® DD 单细胞解交联试剂盒 V1.0 K02101-0806	1	●	DCL Buffer	R0012301	0.5 mL×2 管
		●	Enzyme K1	R0012401	90 µL×2 管
		●	Buffer S	R0012501	0.5 mL
		●	Buffer T	R0012601	0.5 mL
SeekOne® DD 单细胞文库扩增试剂盒 V1.0 K02101-0807	1	●	2×PCR Master Mix	R0002102	240 µL×4 管
		●	Pre-Primers	R0012702	30 uL
		●	Post-Primers	R0012802	30 uL
		●	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	2	○	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 单细胞油包水连接试剂盒：-20±5℃保存，干冰运输；
 SeekOne® DD 单细胞解交联试剂盒：室温保存，常温运输；
 SeekOne® DD 单细胞文库扩增试剂盒：-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：

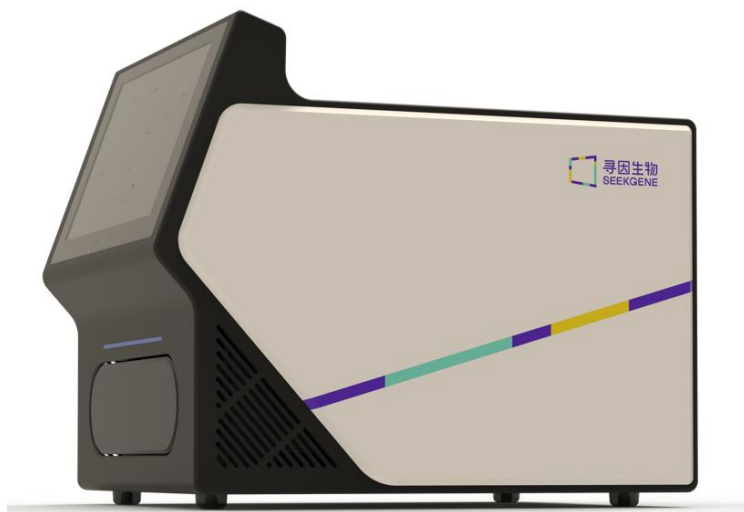
N5	5' AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC[N5]ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT 3'
N7	5' GATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCAC[N7]ATCTCGTATGCCGTCTTCTGCTTG 3'

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)
核酸片段分析仪	Agilent, G2991AA (Agilent 4200 TapeStation 系统) Agilent, G2939BA (Agilent 2100 生物分析仪) Bioptic, Qsep400 (Qsep400)
PCR 仪	Thermo Fisher Scientific, 4375786 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 圆周震荡器及附件)
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

实验操作步骤

Step 1 体外逆转录反应

实验前准备

- 提前准备好冰盒；
- 提前 30 min 将 3× RT buffer、Reducing Buffer 从-20℃取出冰上解冻，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 30 min 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。

1. 按照下表配单样本所需 Wash Buffer 及 1× PBS-RI

组分	Wash Buffer	1× PBS-RI
1× PBS	3 mL	0.5 mL
● RNase Inhibitor	7.5 μL	1.25 μL
● Buffer T	30 μL	/
Total	3 mL	0.5 mL

2. 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 μL
● FFPE RT Primers	3 μL
● Reducing Buffer	1.6 μL
Total	38.4 μL

3. 确定细胞核投入量，计算细胞核上样体积，先加入（41.6 (μL) -单细胞核悬液上样体积 (μL) ）的 1× PBS-RI 至 Mix 吹打混匀；再加入对应的单细胞核悬液（单细胞核悬液加入前需吹打混匀）；最终单细胞核混合液总体积为 80 μL，然后进行逆转录反应。逆转录程序如下（热盖 85 °C）

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
	42°C	5 min	
	4°C	Hold	

4. 逆转录反应结束后瞬离，吹打混匀后，将反应液转移新的 1.5 mL 离心管中；

5. 加入 1.3 mL Wash Buffer，吹打混匀，1000 g 4°C 离心 5 min，去上清液；重复此步骤一次；

注：吸取上清时，预留 50 μL 液体，避免吸到细胞沉淀，导致细胞损失。



6. 加入 1 $\times$ PBS-RI 重悬，计数。

注：可根据细胞捕获数确定重悬体积，推荐细胞浓度在 500-1200 个/ μL 。

Step 2 油包水生成及 Barcode 标记

实验前准备

- ☐ 提前准备好冰盒；
- ☐ 提前 30 min 将 10 $\times$ Ligation Buffer、Reducing Buffer 和 Primer R 从 -20 $^{\circ}\text{C}$ 取出解冻，充分振荡后瞬时离心，置于冰盒上备用；
- ☐ DNA Ligase Mix 使用前从 -20 $^{\circ}\text{C}$ 取出，瞬时离心后立即使用；
- ☐ 提前从 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱取出 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 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱，短时间内的冻融容易导致胶珠密度、粘稠度改变。

Step 2-1 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反应 Mix 后再使用）；

组分	体积/样本
○ 10 $\times$ Ligation Buffer	8 μL
● DNA Ligase Mix	5.2 μL
● Primer R	2.4 μL
● Reducing Buffer	1.6 μL
Total	17.2 μL

注：DNA Ligase Mix 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。

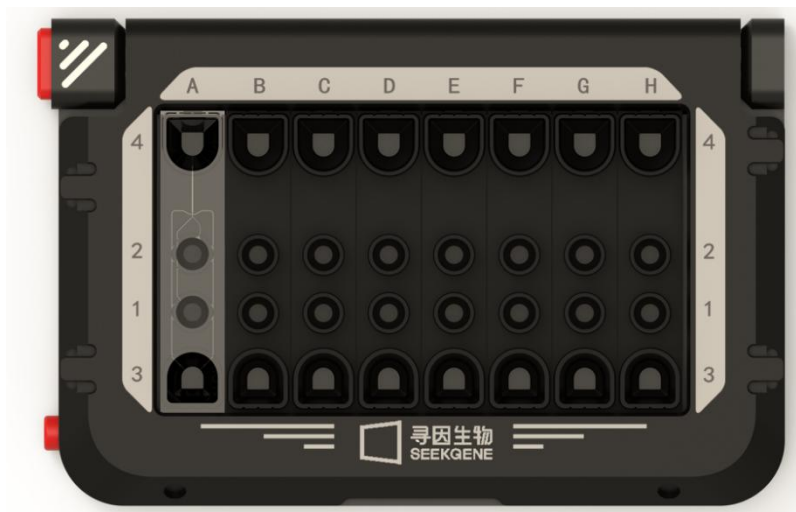
2. 根据注 2 确定上样细胞核数，计算细胞核上样体积，先加入相应体积【62.8 (μL) - 单细胞核悬液上样体积 (μL)】的 1 $\times$ PBS-RI 至 Mix 吹打混匀；再加入对应的单细胞核悬液（单细胞核悬液加入前需吹打混匀）；最终 Mix 总体积为 80 μL 。

注 1：多样本同时上机时，待所有样本补加 1 $\times$ PBS-RI 完成后再加入混匀的单细胞核悬液，减少操作时间，防止细胞长时间在 Mix 中 RNA 扩散。

注 2：FFPE 样本细胞核细胞捕获率 25% $\pm$ 10%；根据需要的细胞产出数，确定上样细胞核数；FFPE 细胞核捕获率低可能是由于细胞核核膜完整性差；细胞核 RNA 质量差，含量低；细胞核 RNA 含量异质性；细胞核悬液有核率低等原因导致的。

Step 2-2 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 液体内部没有气泡，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；

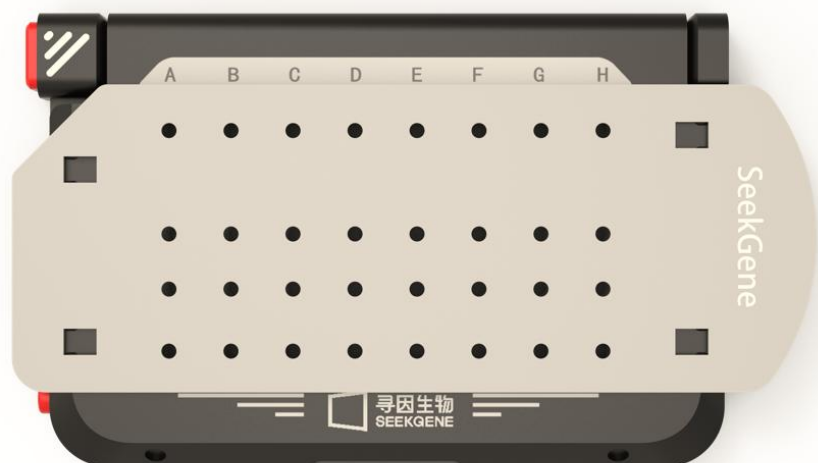
注 1：加试剂时，移液器吸头随着液面移动，始终保持吸头尖在液面 3 mm 以下，避免产生气泡；

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 2-3 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；

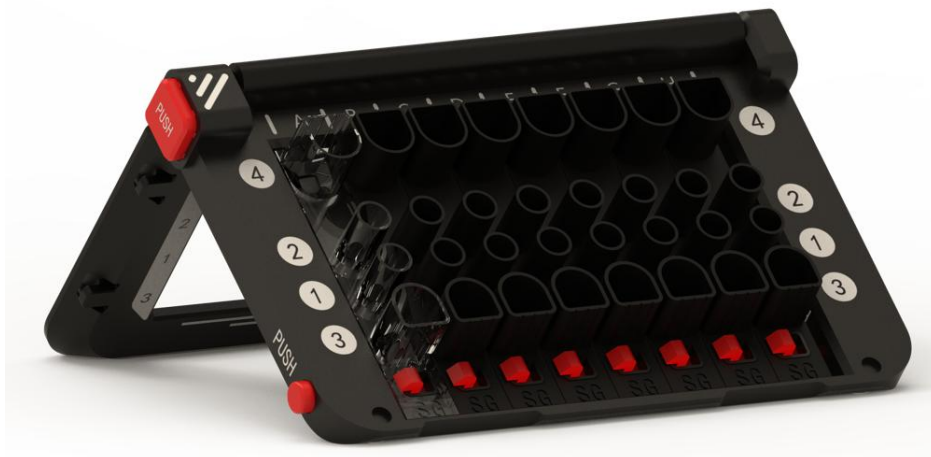


4. 程序运行结束后，点击“出仓”按钮，取出夹具。立即进行下一步实验。



Step 2-4 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 <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：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油状；
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、震荡，转出的油包水立即进行连接反应。

Step 2-5 油包水连接反应

1. 将 Step2-4 中装有油包水的 PCR 管，放入 PCR 仪中运行下列程序，PCR 热盖 85 $^{\circ}\text{C}$ ，体积 100 μL ；

温度	时间
20°C	60 min
65°C	10 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连接反应，结束后离心合并成一管。

STOPPING POINT：此步反应结束后的油包水可在 4°C 过夜，或者 -80°C 最多储存 4 天。

Step 3 解交联和纯化

实验前准备

- 提前准备好冰盒；
- 提前 30 min 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 3 mL；
- 提前 30 min 将 Cleanup Beads 和 DNA 分选磁珠平衡至室温备用。

注：在使用过程中，DCL buffer 若出现白色固状或结晶，可 55 °C 加热至溶液透明后使用；透明即可，请勿长时间放置。

Step 3-1 油包水破乳

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

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 1 和 2 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解交联反应；

Step 3-2 解交联

- 将 Step3-1 破油后的液体全部转移至新的 1.5 mL 离心管中，加入 90 µL DCL Buffer 和 18 µL Enzyme K1，震荡混匀；

STOPPING POINT：此步结束后可放置于 -80°C 过夜保存。

- 样本置于恒温金属浴中，运行以下程序：55°C 500 rpm 15 min, 80°C 500 rpm 30 min；

STOPPING POINT：此步结束后可放置于 -80°C 过夜保存；-80°C 保存的解交联产物可置于 55°C 金属浴中融化，再进行 Cleanup beads 纯化。

Step 3-3 纯化

- 按照下表要求配制 Cleanup Mix：

组分	体积/样本
○ Cleanup Beads	390 µL
● Reducing Buffer	10 µL
Total	400 µL

- 向每管样本加入 396 µL 振荡混匀后的 Cleanup Mix，轻轻缓慢吹打至少 15 次，37°C 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。

- 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 1：在此过程中若出现乳白色浑浊或者凝固状态，可置于 55°C 金属浴中至澄清（约 1min），切勿长时间放置。

注 2：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. 加入 50 μ L Nuclease-free Water，再加入 60 μ L（1.2x）DNA 分选磁珠，吹打混匀；
6. 将混匀好的产物室温静置 5 min 后，置于磁力架上吸附至溶液澄清，去除上清；
7. 保持在磁力架上加入 800 μ L 80%乙醇，约 30 sec 后小心去除上清；重复此步骤一次；
8. 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；
9. 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 46 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。

10. 置于磁力架上吸附至溶液澄清，转移上清 44.6 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 二次逆转录反应

实验前准备

- ❑ 提前准备好冰盒；
 - ❑ 提前 30 min 将 3 $\times$ RT buffer、Reducing Buffer 从 -20 $^{\circ}$ C 取出冰上解冻，充分振荡后瞬时离心，置于冰盒上备用；
 - ❑ RT Enzyme 使用前从 -20 $^{\circ}$ C 取出，瞬时离心后立即使用；
 - ❑ 提前 30 min 从 -80 $^{\circ}$ C 取出 TSO 冰上解冻，充分振荡后瞬时离心，置于冰盒上备用。
1. 解冻后的 TSO 充分振荡后瞬时离心后，按照下表对进行稀释，剩余稀释 TSO 可置于 -80 $^{\circ}$ C 保存；

组分	体积/样本
○ TSO	1 μ L
Nuclease-free Water	8 μ L
Total	9 μ L

2. 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反应 Mix 后再使用）；

组分	体积/样本
● 3 $\times$ RT Buffer	26.6 μ L
● RT Enzyme	5.2 μ L
稀释 TSO	2 μ L
● Reducing Buffer	1.6 μ L
Total	35.4 μ L

3. 将配制好的上述试剂加入到 Step3-3 纯化后的 44.6 μ L cDNA 产物中，吹打混匀 10 次，瞬时离心，然后进行逆转录反应。PCR 热盖 85 $^{\circ}$ C，体积 80 μ L，逆转录程序如下：

温度	时间
42 $^{\circ}$ C	90 min
4 $^{\circ}$ C	Hold

STOPPING POINT: 逆转录后产物可在 4℃最多储存 72 h, 或-20℃最多储存 1 周。

Step 5 二次逆转录产物纯化

1. 逆转录反应结束后, 加入 96 μL (1.2 $\times$) 的 DNA 分选磁珠, 吹打 10 次混匀或振荡混匀后瞬时离心;

注: 1.2 $\times$ 是指加入的 DNA 分选磁珠与二次逆转录产物的体积比, 即 96 μL / 80 μL =1.2 $\times$ 。

2. 将混匀好的产物室温静置 5 min 后, 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 300 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. 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 24 μL Nuclease-free Water 充分悬浮磁珠, 室温静置 5 min;

6. 置于磁力架上吸附至溶液澄清, 转移 23 μL 上清至新的 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: 逆转录纯化产物可在 4℃最多储存 72 h, 或-20℃最多储存 1 周。

Step 6 cDNA 富集与纯化

Step 6-1 cDNA 富集

1. 配制 cDNA 扩增 Mix:

组分	体积/样本
● 2 $\times$ PCR Master Mix	25 μL
● Post-Primers	2 μL
Total	27 μL

2. 将配制好的 27 μL cDNA 扩增 Mix 加入到 Step 5 纯化后的 23 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
12	98℃	3 min
	98℃	10 sec
	63℃	15 sec
	72℃	1 min
	72℃	5 min
	4℃	Hold

Step 6-2 cDNA 富集产物纯化

1. 吸取 50 μL (1 $\times$) 的 DNA 分选磁珠加入 Step 6-1 PCR 产物中, 吹打 10 次混匀或振荡混匀;

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

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

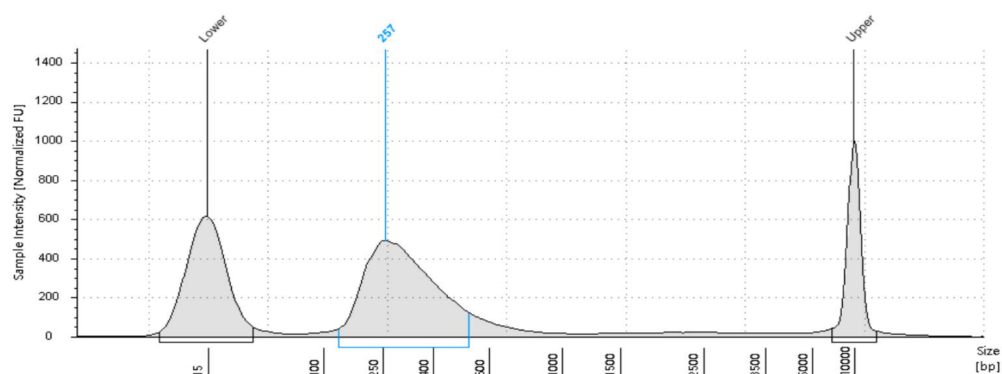
6. 置于磁力架上吸附至溶液澄清, 转移上清 40 μL 至新的 0.2 mL PCR 管中。

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 富集产物纯化后可在 4°C 最多储存 72 h, 或 -20°C 下最多储存 1 个月。

Step 6-3 cDNA 富集产物质检标准

1. 上样细胞数 3,000-6,000 个, cDNA 富集产物浓度(Qubit) $\geq 0.2 \text{ ng}/\mu\text{L}$, 产物峰型在 180-800 bp 范围 (Agilent 4200 TapeStation), 判定合格;
2. 上样细胞数 6,000-1,2000 个, cDNA 富集产物浓度(Qubit) $\geq 0.4 \text{ ng}/\mu\text{L}$, 产物峰型在 180-800 bp 范围 (Agilent 4200 TapeStation), 判定合格;
3. 上样细胞数 1,2000-2,4000 个, cDNA 富集产物浓度 $\geq 0.6 \text{ ng}/\mu\text{L}$, 产物峰型在 180-800 bp 范围, 判定合格;
4. cDNA 富集产物浓度 $0.1 \text{ ng}/\mu\text{L} \leq \text{浓度 (Qubit)} < 0.6 \text{ ng}/\mu\text{L}$, 产物峰型在 180-800 bp 范围 (Agilent 4200 TapeStation), 判定为风险;
5. cDNA 富集产物 $< 0.1 \text{ ng}/\mu\text{L}$, 判定为不合格;



Step 7 文库扩增与纯化

Step 7-1 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× PCR Master Mix	25 μL
● N5	1 μL
● N7	1 μL
Nuclease-free Water	13 μL
Total	40 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。

2. 吸取 10 μL cDNA 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°C, 体积 50 μL 。

扩增循环数	温度	时间
	98°C	3 min
7-13 cycle	98°C	20 sec

(见下表)	54°C	30 sec
	72°C	1 min
	72°C	5 min
	4°C	Hold

cDNA 投入量	推荐扩增循环数
10-50 ng	7-9
1-10 ng	9-13

注：如 cDNA 浓度高于 5 ng/μL，则直接取 50 ng cDNA 进行下一步扩增；

Step 7-2 文库纯化

1. 反应结束后瞬时离心，加入 45 μL DNA 分选磁珠（0.9×），用移液器吹打 10 次混匀或振荡混匀；

注：0.9×是指加入的 DNA 分选磁珠与 PCR 产物的体积比，即 45 μL / 50 μL=0.9×。

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. 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）；

6. 加入 31 μL Nuclease-free Water 充分悬浮磁珠，室温静置 5 min 后瞬离；

7. 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：文库纯化产物在-20°C下最多储存 6 个月。

Step 7-3 文库质控标准

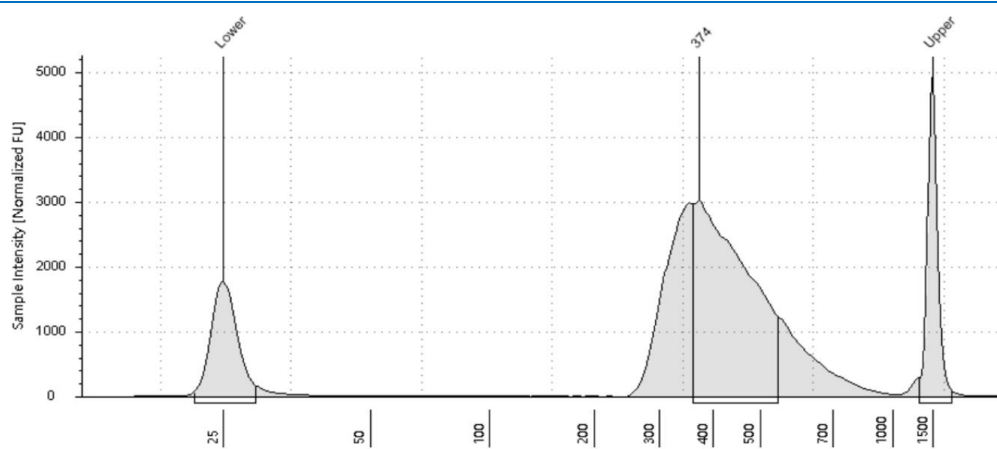
1. 文库浓度(Qubit)≥5 ng/μL，主峰在 200-900 bp 范围，无大片段污染（Agilent 4200 TapeStation），判定合格；

2. 文库浓度(Qubit)≥ 5 ng/μL，主峰在 200-900 bp 范围，但有大片段污染，大片段高度低于目标片段高度，再次分选直至无大片段，可风险上机；

3. 1 ng/μL≤文库浓度(Qubit)<5 ng/μL，主峰在 200-900 bp 范围，无大片段污染，可风险上机；

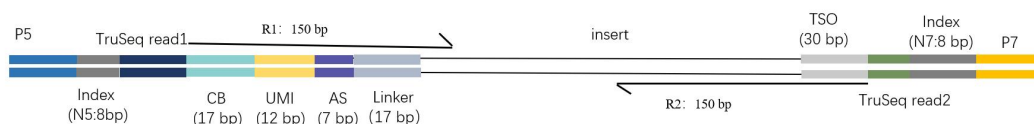
4. 文库浓度(Qubit)<1 ng/μL，或在 200-900 bp 无目的片段，或在 200-900 bp 有目的片段，无明显主峰，或大片段高度高于目标片段高度，判定不合格。

注：如果有大片段再进行一次 0.5×加 0.4×分选，直至无大片段。



附录 1：高通量测序

1. 测序文库：SeekOne® DD FFPE 单细胞转录组以 P5 开始, P7 结束, 其中 cell barcode 包含 17 bp, UMI 包含 12 bp, 锚定序列包含 7 bp, 连接序列包含 17 bp, 模板转换序列包含 30 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	≥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
	HiSeq 2500(RR)	11	1
	HiSeq 4000	240	1
	NovaSeq	150*/300	1

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

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

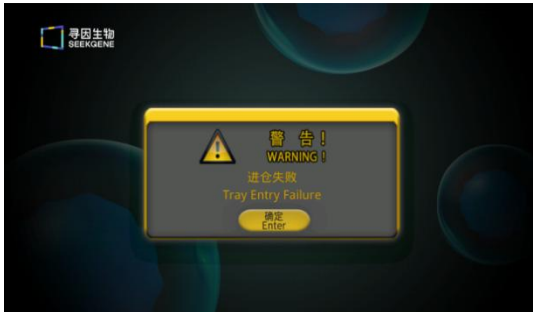
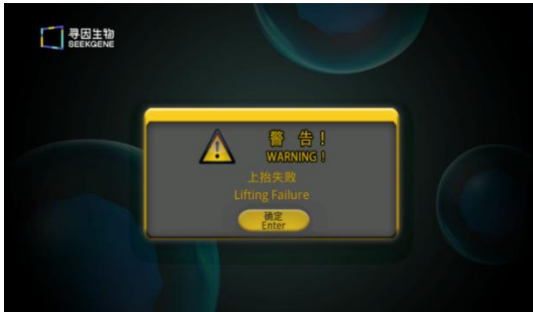
1. 分析软件: 单细胞数据分析采用北京寻因生物自主研发的 SeekSoul Tools; SeekSoul Tools 可识别 Cell Barcode, 比对定量, 得到下游分析的细胞表达矩阵, 用于后续的细胞聚类 and 差异分析。
 - 1) 输入文件: FASTQ (clean data)
 - 2) 输出文件:
bam,html, csv, matrix(filtered_feature_bc_matrix, raw_feature_bc_matrix)
 - 3) 操作系统: Linux
2. 软件获得: 点击 <http://seeksoul.seekgene.com/index.html>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

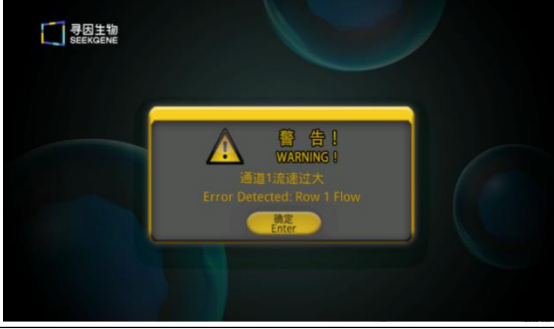
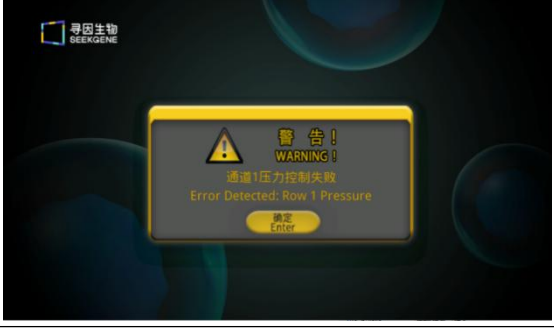
附录 3: SeekOne® 数字液滴仪使用说明

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	生效日期
1	新建	2024. 02. 29
2	修订	2024. 04. 01
3	修订	2024. 06. 14
4	修订	2024. 12. 26