

编号:H-020-000553-00



DNBelab C系列 高通量单细胞 RNA文库制备试剂盒套装 V2.0

使用说明书

版本:1.0

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

仅供科研使用

深圳华大智造科技股份有限公司

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 V2.0。说明书版本 1.0。试剂盒版本 V1。

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。说明书作为仪器的一部分，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仪器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，请以购买的仪器为准。

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。

©2023 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
编制	2023 年 1 月 16 日	1.0



- 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	2
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 注意事项	7

第 2 章 样本要求及处理	8
2.1 注意事项	8
2.2 实验前准备	8
2.2.1 样本要求	8
2.2.2 实验室要求	9
2.2.3 准备试剂	9
2.3 制备细胞（核）悬浮液	10

第 3 章 液滴生成	10
3.1 实验前准备	10
3.1.1 准备试剂与设备	10
3.1.2 准备细胞（核）反应液	11
3.1.3 准备磁珠悬浮液	12
3.2 进行液滴生成	12

第 4 章 破乳	16
4.1 实验前准备	16
4.1.1 准备试剂与设备	16
4.1.2 准备自配试剂	16
4.1.3 准备耗材	17

4.2 进行破乳	17
第 5 章 逆转录与酶切消化	19
5.1 实验前准备	19
5.2 进行逆转录反应	19
5.3 进行酶切反应	21
第 6 章 二链合成	22
6.1 实验前准备	22
6.2 进行二链合成	22
第 7 章 cDNA 和 Oligo 产物扩增及扩增产物分选	24
7.1 实验前准备	24
7.2 进行 cDNA 和 Oligo 扩增	24
7.3 cDNA 产物及 Oligo 产物筛选	25
第 8 章 Oligo 产物文库构建操作流程	27
8.1 实验前准备	27
8.2 Oligo 产物文库构建	28
8.3 Oligo 文库片段筛选	29
第 9 章 cDNA 文库构建操作流程	30
9.1 实验前准备	30
9.2 片段化及末端修复	31
9.3 接头连接	32
9.4 接头连接产物纯化及片段筛选	33
9.5 PCR 扩增	34
9.6 PCR 扩增产物筛选	35
9.7 环化文库构建 (cDNA 文库和 Oligo 文库)	36
第 10 章 测序	37
10.1 文库结构	37
10.2 MGISEQ-2000RS 测序平台实验要求	37
10.3 DNBSEQ-T7RS 测序平台实验要求	39

附录 1 常见样本类型 cDNA 扩增反应循环数	41
附录 2 关于 DNA Clean Beads 及纯化	41
附录 3 关于 scRNA Barcode Primer II (1-16) 使用	42
附录 4 制造商信息	45

--- 此页有意留白 ---

第 1 章 产品信息

本章介绍产品基本信息，包括技术信息、适用范围、适配测序平台、试剂盒信息、自备物料清单以及注意事项。


1.1 产品描述

DNBelab C 系列细胞组学整体解决方案，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，可实现便携式、即时化、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 V2.0 使用 MGI 自主设计的 C4 液滴生成装置，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，将单细胞或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。本产品采用了破乳回收系统，以及 mRNA 捕获磁珠和液滴识别微珠，可以提高磁珠回收效率以及捕获 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

本试剂盒适用于人或鼠的高通量单细胞 RNA 文库构建，使用前需将样本制备成单细胞或单细胞核悬液。

 **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

本试剂盒套装共包含 5 个模块。

表 1 DNBelab C 系列 高通量单细胞RNA文库制备试剂盒套装 V2.0 (16 RXN)
(货号: 940-000519-00)


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 V2.0 (盒 1 液滴生成模块) (货号: 940-000508-00)	Cell Beads-V2	白色	1.6 mL/ 管 ×1
	Lysis Buffer	黑色	1.584 mL/ 管 ×1
	Cell Solution	蓝色	528 μL/ 管 ×1
	Index Carrier	绿色	608 μL/ 管 ×1
	Suspension Reagent-V2	棕色	320 μL/ 管 ×1
	P50 Oil	本色	12.8 mL/ 瓶 ×1
	Stop Buffer	本色	12.8 mL/ 管 ×1
	Denaturation Buffer (10×)	本色	6.4 mL/ 瓶 ×1
	DNA Clean Beads	本色	7.19 mL/ 瓶 ×2
	Collection Buffer	棕色	22.4 mL/ 瓶 ×1
	Wash Buffer	棕色	32 mL/ 瓶 ×1
DNBelab C 系列 高通量单细胞 RNA 文库制备试剂盒套装 V2.0 (盒 2 液滴生成模块) (货号: 940-000509-00)	DIR Reagent-V2	黑色	176 μL/ 管 ×1
	RNase Inhibitor	棕色	176 μL/ 管 ×1
	RT Buffer	蓝色	1.54 mL/ 管 ×2
	RT Primer-V2	蓝色	160 μL/ 管 ×1
	RT Enzyme	蓝色	160 μL/ 管 ×1
	D Buffer	橙色	320 μL/ 管 ×1
	D Enzyme	橙色	160 μL/ 管 ×1
	Second Strand Buffer-V2	绿色	1.08 mL/ 管 ×2
	Second Strand Primer-V2	绿色	240 μL/ 管 ×1
	Second Strand Enzyme-V2	绿色	800 μL/ 管 ×1
	cDNA Amp Enzyme	白色	800 μL/ 管 ×2
cDNA Amp Primer-V2	白色	128 μL/ 管 ×1	

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 V2.0 (盒 3 建库模块) (货号: 940-000510-00)	Frag Enzyme-V2	紫色	80 μ L/ 管 \times 1
	Frag Buffer-V2	紫色	160 μ L/ 管 \times 1
	DNA Ligase-V2	橙色	80 μ L/ 管 \times 1
	Ligation Buffer-V2	橙色	320 μ L/ 管 \times 1
	scRNA Adapter-V2	橙色	80 μ L/ 管 \times 1
	PCR Amp Enzyme	白色	1.2 mL/ 管 \times 1
	scRNA Barcode Primer II-1	红色	32 μ L/ 管 \times 1
	scRNA Barcode Primer II-2	红色	32 μ L/ 管 \times 1
	scRNA Barcode Primer II-3	红色	32 μ L/ 管 \times 1
	scRNA Barcode Primer II-4	红色	32 μ L/ 管 \times 1
	scRNA Barcode Primer II-5	红色	32 μ L/ 管 \times 1
	scRNA Barcode Primer II-6	红色	32 μ L/ 管 \times 1
	scRNA Barcode Primer II-7	红色	32 μ L/ 管 \times 1
	scRNA Barcode Primer II-8	红色	32 μ L/ 管 \times 1
	scRNA Barcode Primer II-9	红色	32 μ L/ 管 \times 1
	scRNA Barcode Primer II-10	红色	32 μ L/ 管 \times 1
	scRNA Barcode Primer II-11	红色	32 μ L/ 管 \times 1
scRNA Barcode Primer II-12	红色	32 μ L/ 管 \times 1	
scRNA Barcode Primer II-13	红色	32 μ L/ 管 \times 1	
scRNA Barcode Primer II-14	红色	32 μ L/ 管 \times 1	
scRNA Barcode Primer II-15	红色	32 μ L/ 管 \times 1	
scRNA Barcode Primer II-16	红色	32 μ L/ 管 \times 1	
DNBelab C 系列 C4 装置 (货号: 940-000507-00)	C4 装置	/	1 个
DNBelab C 系列 C4 载片 V2.0 (货号: 940-000506-00)	C4 scRNA 载片	/	16 个 / 盒 \times 1
	C4 过滤器连接管	/	1 个 / 包 \times 1
	C4 过滤器	/	16 个 / 包 \times 1
	C4 载片杯套	/	16 个 / 盒 \times 1

1.5 试剂盒储存条件及有效期

表 2 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 文库制备试剂盒套装 V2.0 (盒 1 液滴生成模块) (货号: 940-000508-00)	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 文库制备试剂盒套装 V2.0 (盒 2 液滴生成模块) (货号: 940-000509-00)	-25 °C ~ -15 °C	-80 °C ~ -15 °C	
DNBelab C 系列高通量单细胞 RNA 文库制备试剂盒套装 V2.0 (盒 3 建库模块) (货号: 940-000510-00)	-25 °C ~ -15 °C	-80 °C ~ -15 °C	
DNBelab C 系列 C4 装置 (货号: 940-000507-00)	10 °C ~ 30 °C	0 °C ~ 30 °C	
DNBelab C 系列 C4 载片 V2.0 (货号: 940-000506-00)	10 °C ~ 30 °C	0 °C ~ 30 °C	

-  提示
- 运输温度为 -80 °C ~ -15 °C 的试剂盒需要使用干冰运输，且需要在收到产品时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 3 自备物料清单

类型	名称	推荐品牌	货号
仪器	超净工作台	/	/
	显微镜	/	/
	 提示 需使用荧光显微镜计数细胞核。		
	电子天平	/	/
	微型真空泵或同等功能仪器	其林贝尔	GL-802A
	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（100μL 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	A600903-0010
	SSC (20×)	Invitrogen	AM9763
	DAPI	Sigma-Aldrich	D9542
	0.4%台盼蓝溶液或同等功能的分析试剂	Gibco	15250061
	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
	DNBSEQ-T7RS高通量测序试剂套装 (FCL PE100)	MGI	1000016105
	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	/	/	
耗材	1 mL 注射器	/	/
	细胞滤网40 μm蓝色 (独立包装)	CORNING	352340
	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	/

类型	名称	推荐品牌	货号
耗材	1000 μ L / 200 μ L / 100 μ L / 20 μ L / 10 μ L 普通低吸附吸头	Axygen	/
	200 μ L 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
	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	Invitrogen	Q32856
	0.5 mL 透明薄壁 PCR 管	Axygen	PCR-05-C

1.7 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、破乳、逆转录、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。
- 若您有其他疑问，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（核）悬浮液及计数细胞的过程。

2.1 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 4 样本要求

细胞 / 细胞核大小	推荐直径小于40 μm
推荐细胞投入量	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、细胞核和其他组织解离样本：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%

表 5 细胞投入推荐

目的投入细胞数（个）	推荐细胞浓度（个 / μL ）
5000	208 < N < 2000
10000	416 < N < 2000
20000	832 < N < 2000
30000	1250 < N < 2000

-  提示
 - N 表示细胞浓度。
 - 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。
- 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 min，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 min。
 - 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：

- BSA

表 6 10% BSA

试剂名称	用量
BSA 粉末	1 g
PBS (不含 Ca ²⁺ , Mg ²⁺)	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 -20 °C ~ -15 °C 条件下最多可保存 6 个月。

- PBS

表 7 PBS (含 0.04% BSA)

试剂名称	用量
PBS	49.8 mL
10% BSA	200 μL

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

- 细胞系、实体组织等不同的样本

采用恰当的方法制备单细胞悬浮液，并用 PBS（含 0.04% BSA）清洗 2 次。用适量体积的 PBS（含 0.04% BSA）重悬细胞，接着使用 40 μm 的细胞筛过滤后测细胞悬液浓度并记录。

- 细胞核样本


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。用适量体积的 PBS（含 0.04% BSA）重悬细胞核，接着使用 40 μm 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（核）样本。

 注意 用细胞计数板或血球计数板检测细胞（核）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 V2.0 将细胞（核）悬液制备成液滴，在液滴中完成细胞裂解及磁珠捕获 mRNA 的过程，整个过程耗时约 50 min。

-  提示
- 本章操作建议在标准大气压下进行，尽量避免使用正压或负压实验室。
 - 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 实验前准备

3.1.1 准备试剂与设备


表 8 准备清单

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 V2.0（盒 1 液滴生成模块） （货号：940-000508-00）	Cell Beads-V2	白色	1.6 mL/ 管 ×1
	Lysis Buffer	黑色	1.584 mL/ 管 ×1
	Cell Solution	蓝色	528 μL / 管 ×1
	Index Carrier	绿色	608 μL / 管 ×1
	P50 Oil	本色	12.8 mL/ 瓶 ×1

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 V2.0 (盒 2 液滴生成模块) (货号: 940-000509-00)	DIR Reagent-V2	黑色	176 μ L/ 管 \times 1
	RNase Inhibitor	棕色	176 μ L/ 管 \times 1
DNBelab C 系列 C4 装置 (货号: 940-000507-00)	C4 装置	/	1 个
DNBelab C 系列 C4 载片 V2.0 (货号: 940-000506-00)	C4 scRNA 载片	/	16 个 / 盒 \times 1
	C4 载片杯套	/	16 个 / 盒 \times 1

 提示 提前取出 P50 Oil 并置于室温平衡至少 30 min。

3.1.2 准备细胞（核）反应液


 提示 配制体系时应适当增加配液量，以避免液滴生成时细胞（核）反应液加液量不足 80 μ L。


操作步骤如下：

1. 用移液器轻轻吹吸混匀第 8 页“样本要求及处理”中准备好的细胞（核）悬液。按下表配制细胞（核）反应液。

表 9 细胞（核）反应液体系

组分	单个反应体积 (μ L)
Cell Solution	24
Index Carrier	28
RNase Inhibitor	4
PBS (含 0.04% BSA)	24-X
细胞悬浮液	X
总体积	80

-  提示
- X 代表细胞悬浮液的体积。
 - 细胞（核）投入总量范围可在 5000~30000，细胞（核）体积最多为 24 μ L，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。
2. 体系配制好后，将移液枪量程调至 70 μ L，轻轻吹吸至完全混匀并瞬离，放置冰上待用。


-  提示
- 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。

3.1.3 准备磁珠悬浮液


-  提示
- 此步骤需在超净台中进行。
 - 为避免液滴生成时磁珠悬浮液加液量不足 80 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-V2，上下颠倒或吹吸至完全混匀。
- 吸取单份样本用量 100 μL Cell Beads-V2 到 0.2 mL 低吸附 PCR 管中，置于磁力架上静置 3~5 min，缓慢弃掉上清。
- 从磁力架上取下 PCR 管，加入 72 μL Lysis Buffer。

-  提示 准备液滴生成前，再将 DIR Reagent-V2 加入磁珠悬浮液。加入时需轻柔吹吸混匀，避免气泡产生。

- 加入 8 μL DIR Reagent-V2 至磁珠悬液，将移液枪量程调至 70 μL ，轻轻吹吸至完全混匀，瞬时离心，置于冰上，等待加载。

-  提示
- 可根据样本个数调整 PCR 管的体积。
 - 若有多个样本，可在低吸附 1.5 mL 离心管中合并处理。

3.2 进行液滴生成

操作步骤如下：

- 取出 C4 scRNA 载片和 C4 装置，并将 C4 装置放在水平桌面上。

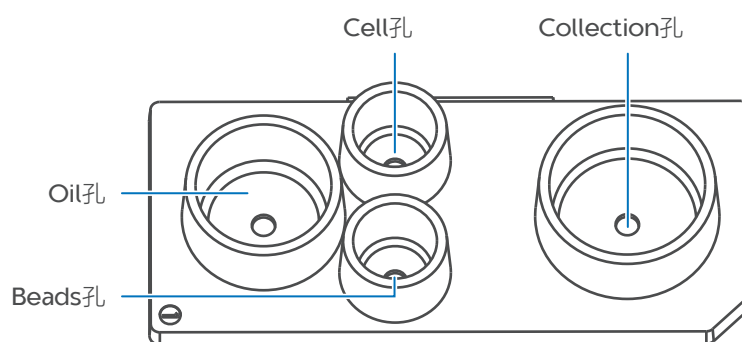


图 1 C4 scRNA 载片

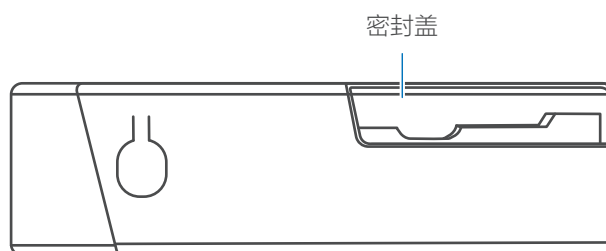


图 2 C4 装置

2. 执行以下操作:

1) 拇指按压卡扣, 其余手指抵住另一端, 速度轻缓、均匀用力轻压。

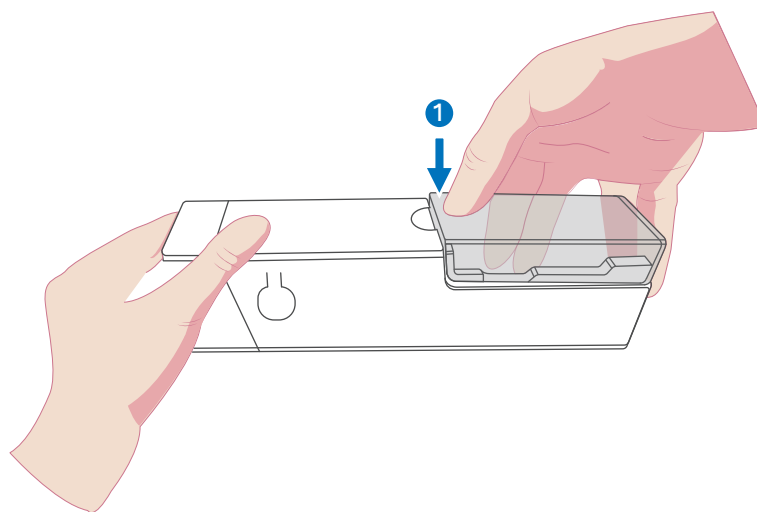


图 3 密封盖开启1

2) 轻轻上提以打开密封盖。

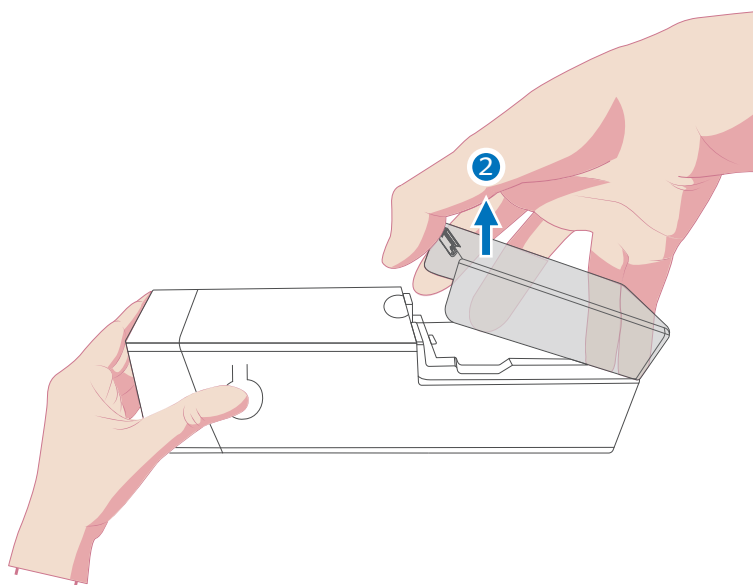


图 4 密封盖开启2

3. 实验前, 用 75% 乙醇清洁密封盖上的内垫。

4. 装置侧面推入载片槽。载片左边缘必须与载片槽左边缘完全契合, 无缝隙。

5. 按照下表向孔内加入相应溶液。

顺序	溶液	加入量 (μL)	孔位
1	Cell (nucleus) suspension	80	Cell well
2	P50 Oil	800	Oil well
3	Beads suspension	80	Beads well

加液完成后的 C4 装置如下图所示。

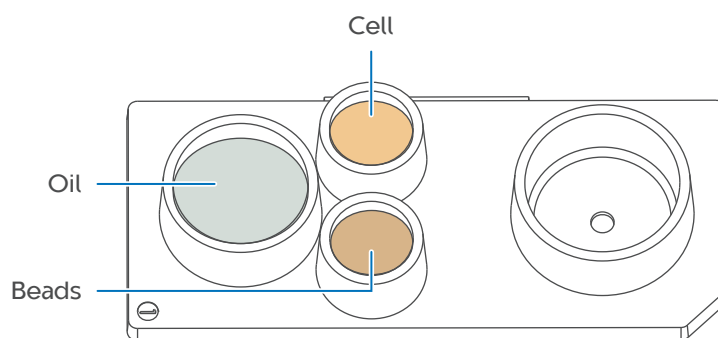



图 5 载片装载及加液示意图

-  提示
- 细胞（核）悬液和磁珠悬浮液加样前充分吹吸混匀；吹吸时避免产生气泡。
 - 加样时，吸头勿悬空，应靠近进液孔边缘缓缓打入。
 - 三个加液孔的加液总时长尽量控制在 1 min 以内。

6. 执行以下操作以关闭密封盖：

- 1) 将密封盖尾端对正插入 C4 装置外壳凹槽。
- 2) 左手拇指压住 C4 装置的另一端。
- 3) 右手拇指将密封盖前端卡扣压入到卡槽中，使其完全密封（通常有一声“哒”响）。

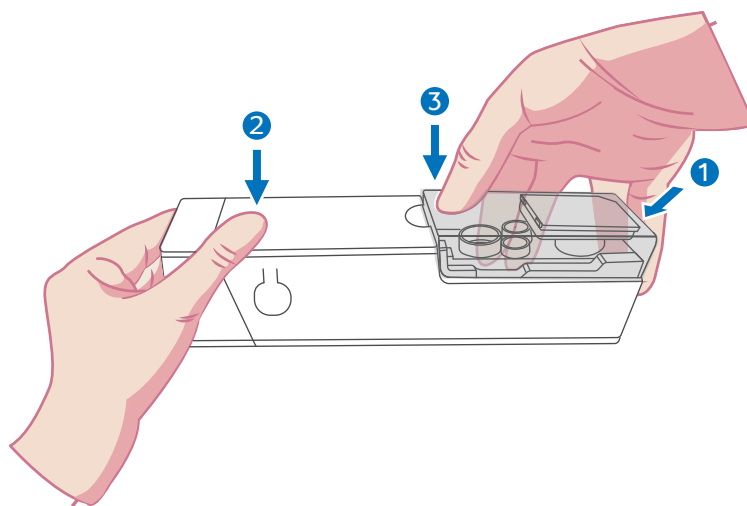



图 6 密封盖扣合

7. 固定 C4 装置前部，并将 C4 装置尾部（图中尾部 Tail 位置）拉出至听到“咔哒”声，液滴收集开始。液滴生成的前 1~2 min，注意观察液滴收集孔内的液滴是否正常生成。

 提示 拉动 C4 装置尾部时，要保持 C4 装置固定，不能左右摇摆，否则会造成液体溢洒影响液滴生成。

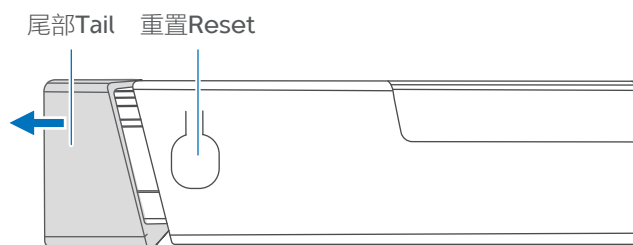




图 7 C4装置启动

8. 待液滴生成（约 9 min）后，按压卡扣松开密封盖，停止收集液滴。


 提示 液滴生成时间应严格控制在 9 min 以内。

9. 室温静置 20 min。

 注意

- 室温孵育目的是让磁珠上的引物与 mRNA 充分杂交结合，时间过短会降低 mRNA 捕获效率，孵育时间太长会导致 mRNA 降解，孵育时间不能超过 30 min。
- 在室温孵育期间，尽量减少载片移动，以防止收集孔液滴溅出。
- 静置期间需将密封盖保持轻扣状态，防止异物落入。

10. 取下密封盖，再将 C4 载片杯套安装在 C4 载片上，并取下载片，以进行下一步破乳。

 提示 生成的液滴应立即用于破乳。

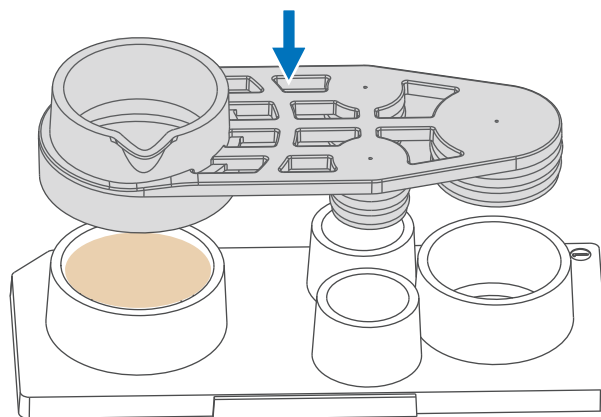


图 8 C4载片杯套安装1

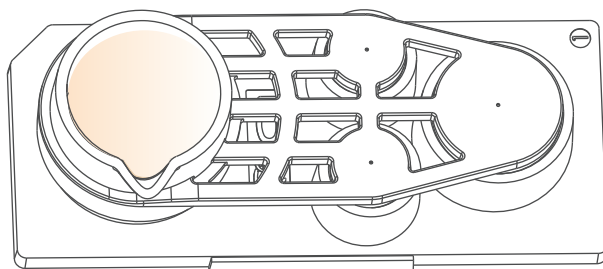


图 9 C4载片杯套安装2

11. 按住 C4 装置两侧的重置 Reset 处，将 C4 装置尾部向内推回至原位。
12. 实验后需用 75% 乙醇清洁密封盖上的内垫。

第 4 章 破乳

本章介绍通过破乳回收系统（需自备真空泵）进行单细胞磁珠回收的过程，整个过程耗时约 20 min。

 提示 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。

4.1 实验前准备

4.1.1 准备试剂与设备

表 10 准备清单

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 V2.0 (盒 1 液滴生成模块) (货号: 940-000508-00)	Collection Buffer	棕色	22.4 mL/ 瓶 ×1
DNBelab C 系列 C4 载片 V2.0 (货号: 940-000506-00)	C4 过滤器连接管	/	1 个 / 包 ×1
	C4 过滤器	/	16 个 / 包 ×1

4.1.2 准备自配试剂

操作步骤如下：

1. 按下表准备 6× SSC。

表 11 6× SSC

试剂名称	用量
20× SSC	15 mL
NF Water	35 mL

2. 试剂振荡混匀后备用。

4.1.3 准备耗材

- 50 mL 离心管
- C4 过滤器
- 真空泵
- C4 过滤器连接管


4.2 进行破乳

操作步骤如下：


1. 将 C4 过滤器与真空泵（图中未示出）的 A 管和 B 管连接，启动真空泵。



图 10 C4过滤器与真空泵连接示意图

-  提示
- 真空泵自带 A 管与 B 管。
 - 用 C4 过滤器连接管连接真空泵软管和 C4 过滤器。
 - 真空泵调节压力参数需调节至 0.08 MPa 或 800 mbar。
 - 磁珠回收过程中，真空泵应保持常开状态，注意磁珠不要过于干燥。

2. 用约 4.5 mL 6× SSC 预润洗 C4 过滤器。
3. 待滤膜上无液体残留，将载片 Collection 孔中所有液滴均匀倒在滤膜表面。
4. 用移液器向 Collection 孔加入 700 μL 6× SSC，吹吸至完全混匀，以收集残余液滴，接着将清洗液一并转移至 C4 过滤器中，并保留该步吸头。
5. 使用上一步保留的吸头，重复 2 次上一步骤。即：用吸头多次吹打收集孔底部及壁上的 beads，将其全部转移至 C4 过滤器中。
6. 待滤膜上无液体残留，快速倒入约 4.5 mL 6× SSC，清洗磁珠。
7. 重复 2 次上一步骤。
8. 待滤膜上无液体残留，关闭真空泵，断开真空泵与 C4 过滤器的连接。
9. 转移 C4 过滤器，并置于 50 mL 离心管中，加入 700 μL Collection Buffer 并轻轻吹吸整个滤膜表面至完全悬浮磁珠。

-  注意
- 吹吸时要小心，防止液体溅出。
 - 吸头不要接触滤膜，防止戳破滤膜。
 - 磁珠回收时手不要触碰滤膜周围，防止传递手的温度导致 RNA 降解。

10. 转移含有磁珠的收集液至 1 个 1.5 mL 低吸附离心管中，保留此步所用吸头，用于下一步骤的清洗。
11. 再用 700 μL Collection Buffer 轻轻吹吸整个滤膜表面，使残留的磁珠充分悬浮，然后转移含有磁珠的收集液到上述 1.5 mL 离心管中。
12. 将离心管置于磁力架上，静置 3~5 min 至完全澄清，缓慢弃掉上清，避免吸到磁珠。

-  提示 若滤膜上有磁珠残留，可吸取该步骤的上清再次冲洗滤膜。

13. 将离心管从磁力架上取下，加入 200 μL 6× SSC，用移液器吹吸并冲洗管壁上的磁珠使之充分悬浮混匀，并平均分到 2 个 0.2 mL PCR 管中，每管约 100 μL。保留该步骤的吸头，用于后续重复利用。
14. 向上述的 1.5 mL 低吸附离心管加入 200 μL 6× SSC，用移液器再次吹吸润洗残余的磁珠使之充分混匀，再将悬液平均分装到上一步已装有磁珠的 2 个 0.2 mL PCR 管中。

-  提示 该步骤使用步骤 13 保留的吸头，不同样本切勿混用。

15. 将 0.2 mL PCR 管置于磁力架上，静置 3~5 min 至完全澄清。

-  提示 为防止磁珠干燥，请提前配制好下一步的反应体系。

第 5 章 逆转录与酶切消化

本章主要描述将磁珠捕获的mRNA转录成cDNA的过程，耗时约3 h。

5.1 实验前准备

表 12 试剂准备清单

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 V2.0 (盒 1 液滴生成模块) (货号: 940-000508-00)	Stop Buffer	本色	12.8 mL/ 管 ×1
	Wash Buffer	棕色	32 mL/ 瓶 ×1
DNBelab C 系列 高通量单细胞 RNA 文库制备试剂盒套装 V2.0 (盒 2 液滴生成模块) (货号: 940-000509-00)	RNase Inhibitor	棕色	176 μL/ 管 ×1
	RT Buffer	蓝色	1.54 mL/ 管 ×2
	RT Primer-V2	蓝色	160 μL/ 管 ×1
	RT Enzyme	蓝色	160 μL/ 管 ×1
	D Buffer	橙色	320 μL/ 管 ×1
	D Enzyme	橙色	160 μL/ 管 ×1

 提示 提前取出 Stop Buffer 并置于室温平衡，直至溶液中的晶体全部溶解。


5.2 进行逆转录反应

操作步骤如下：

- 按下表在冰上配制逆转录反应体系。

表 13 逆转录反应体系

组分	单管反应体积 (μL)
RT Buffer	87.5
RT Primer-V2	5
RT Enzyme	5
RNase Inhibitor	2.5
总体积	100


 **提示** 此配制表是按照每个 PCR 单管所需逆转录反应体系计算的。每个样本需 2 管逆转录反应体系。

2. 涡旋振荡 PCR 管以混匀反应体系，置于冰上待用。
3. 缓慢弃掉第 17 页“进行破乳”步骤 15 中的上清。

 **提示**

- 若上清去除不完全，可使用 10 μL 量程移液器弃掉剩余上清，需避免吸到磁珠。
- 弃掉上清后尽快加入下一步反应试剂以防止磁珠干燥。

4. 吸取 100 μL 逆转录反应体系，加到上一步骤装有磁珠的 0.2 mL PCR 管中，轻弹或上下颠倒混匀，使磁珠重悬，接着瞬时离心将反应体系收集至管底。

 **提示** 切勿吹吸或涡旋混匀，防止吸头黏附导致磁珠损失。


5. 按下表中的条件在 PCR 仪上开始逆转录反应。

表 14 逆转录反应条件（反应体系 100 μL ）

温度	时间	循环数
70 °C (热盖)	On	/
42 °C	90 min	1
50 °C	2 min	10
42 °C	2 min	
65 °C	10 min	1
4 °C	Hold	/

 **停止点** 磁珠可悬浮在反应体系中，此混合液在 4 °C 条件下最多可存放 72 h。

6. 反应结束后，瞬时离心，将 PCR 管置于磁力架上，静置 3~5 min 至完全澄清，弃掉上清（可保留约 10 μL 上清，防止磁珠损失）。
7. 每管加入 200 μL Wash Buffer，等待下一步酶切反应。

 **停止点** 磁珠可悬浮在 Wash Buffer，此混合液在 4°C 条件下最多可存放 24 h。

5.3 进行酶切反应

操作步骤如下：

1. 按下表在冰上配制酶切反应体系。

表 15 酶切反应体系

组分	单管反应体积 (μL)
D Buffer	10
D Enzyme	5
NF Water	85
总体积	100

 **提示** 此配制表是按照每个 PCR 单管所需酶切反应体系计算的。每个样本需 2 管酶切反应体系。

2. 弃掉第 19 页“进行逆转录反应”步骤 7 的 PCR 管中的全部上清液。
3. 每管加入 100 μL 酶切反应体系，轻弹或上下颠倒至完全混匀，接着瞬时离心将反应体系收集至管底。
4. 按下表中的条件在 PCR 仪上开始酶切反应。


表 16 酶切反应条件（反应体系 100 μL）

温度	时间
50 °C (热盖)	On
37 °C	15 min
4 °C	Hold

5. 反应结束后，瞬时离心，将 PCR 管置于磁力架上，静置 3~5 min 至完全澄清，然后弃掉上清。

 **提示** 可保留约 10 μL 上清，防止磁珠损失。

6. 从磁力架取下 PCR 管，每管加入 200 μL Stop Buffer，轻弹或上下颠倒至完全混匀，终止反应。
7. 瞬时离心后，将 PCR 管置于磁力架上，静置 3~5 min，然后弃掉上清（可保留约 10 μL 上清，防止磁珠损失）。
8. 保持离心管置于磁力架上，每管加入 200 μL Wash Buffer。

 **停止点** 磁珠可悬浮在 Wash Buffer，此混合液在 4°C 条件下最多可存放 24 h。


第 6 章 二链合成

本章主要描述 cDNA 二链合成的过程。耗时约 50 min。

6.1 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
DNBelab C 系列 高通量单细胞 RNA 文库制备试剂盒套装 V2.0 (盒 1 液滴生成模块) (货号: 940-000508-00)	Stop Buffer	本色	12.8 mL/ 管 ×1
	Denaturation Buffer (10×)	本色	6.4 mL/ 瓶 ×1
	Wash Buffer	棕色	32 mL/ 瓶 ×1
DNBelab C 系列 高通量单细胞 RNA 文库制备试剂盒套装 V2.0 (盒 2 液滴生成模块) (货号: 940-000509-00)	Second Strand Buffer-V2	绿色	1.08 mL/管×2
	Second Strand Primer-V2	绿色	240 μL/ 管 ×1
	Second Strand Enzyme-V2	绿色	800 μL/ 管 ×1


-  提示
- 提前取出 Stop Buffer 并置于室温平衡，直至溶液中的晶体溶解。
 - 提前将 Denaturation Buffer(10×) 稀释 10 倍，即 100 μL Denaturation Buffer(10×) 中加入 900 μL NF Water，涡旋振荡混匀。
 - 稀释后的 Denaturation Buffer 需要现配现用。

6.2 进行二链合成

操作步骤如下：

1. 将第 21 页“进行酶切反应”步骤 8 中的 PCR 管置于磁力架上，静置 3~5 min 至完全澄清，弃掉上清（可保留约 10 μL 上清，防止磁珠损失）。
2. 每管加入 200 μL 稀释后的 Denaturation Buffer，然后从磁力架上取下 PCR 管，轻弹或上下颠倒至完全混匀，接着瞬时离心将反应体系收集到管底。
3. 室温孵育 5 min，孵育时适当混匀。
4. 瞬时离心，置于磁力架上，静置 3~5 min 至完全澄清，弃掉上清（可保留约 10 μL 上清，防止磁珠损失）。

5. 保持离心管在磁力架上，每管加入 200 μL Wash Buffer，静置 2 min。

 提示 为防止磁珠干燥，请提前配制好下一步的反应体系，建议在磁珠吸附的静置期间进行配制。

6. 按下表配方在冰上配制二链合成反应体系。

表 18 二链合成反应体系

组分	单管反应体积 (μL)
Second Strand Buffer-V2	67.5
Second Strand Primer-V2	7.5
Second Strand Enzyme-V2	25
总体积	100


 提示 此配制表是按照每管所需二链合成反应体系计算的。每个样本需 2 管二链合成反应体系。

7. 彻底弃掉第 22 页“进行二链合成”步骤 5 中 PCR 管中的上清。
 8. 每管加入 100 μL 二链合成反应体系，轻弹或上下颠倒至完全混匀，接着瞬时离心将反应体系收集至管底。
 9. 按下表中的条件在 PCR 仪上开始二链合成反应。

表 19 二链合成反应条件（反应体系 100 μL ）

温度	时间	循环数
50 $^{\circ}\text{C}$ (热盖)	on	/
25 $^{\circ}\text{C}$	10 min	1
37 $^{\circ}\text{C}$	30 min	
4 $^{\circ}\text{C}$	Hold	/

10. 反应结束后，瞬时离心，置于磁力架上，静置 3~5 min，弃掉上清。
 11. 从磁力架取下 PCR 管，每管加入 200 μL Stop Buffer，轻弹混匀，终止反应。
 12. 瞬时离心后，置于磁力架上，静置 3~5 min，弃掉上清(可保留约 10 μL 上清，防止磁珠损失)。
 13. 保持离心管置于磁力架上，每管加入 200 μL Wash Buffer。

 提示 为防止磁珠干燥，请提前配制好下一步的反应体系，建议在离心管置于磁力架的期间进行配制。

第 7 章 cDNA 和 Oligo 产物扩增及扩增产物分选

本章主要描述 cDNA 和 Oligo 产物扩增, 以及对扩增产物进行筛选(cDNA 产物和 Oligo 产物) 的过程。耗时约 1.5 h。

7.1 实验前准备

表 20 试剂准备清单

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 V2.0 (盒 1 液滴生成模块) (货号: 940-000508-00)	Suspension Reagent-V2	棕色	320 μ L/ 管 \times 1
	DNA Clean Beads	本色	7.19 mL/ 瓶 \times 2
DNBelab C 系列 高通量单细胞 RNA 文库制备试剂盒套装 V2.0 (盒 2 液滴生成模块) (货号: 940-000509-00)	cDNA Amp Enzyme	白色	800 μ L/管 \times 2
	cDNA Amp Primer-V2	白色	128 μ L/ 管 \times 1

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


7.2 进行 cDNA 和 Oligo 扩增

操作步骤如下:

- 按下表在冰上配制 cDNA 扩增反应体系。

表 21 cDNA 扩增反应体系


组分	单个反应体积 (μ L)
cDNA Amp Enzyme	50
cDNA Amp Primer-V2	4
Suspension Reagent-V2	10
NF Water	36
总体积	100


 提示 此配制表是按照每管 cDNA 扩增所需 cDNA 扩增反应体系计算。每个样本需 2 管 cDNA 扩增反应体系。

- 将第 22 页“进行二链合成”步骤 13 中的 PCR 管置于磁力架上，静置 3 ~ 5 min 至完全澄清，弃掉上清。
- 每管加入 100 μ L cDNA 扩增反应体系，轻弹至完全混匀，并瞬时离心。
- 按下表中的条件在 PCR 仪上开始 cDNA 扩增反应。

表 22 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 min	1
98 $^{\circ}$ C	20 s	13 ~ 18
60 $^{\circ}$ C	30 s	
72 $^{\circ}$ C	3 min	
72 $^{\circ}$ C	5 min	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。可参考第 41 页“常见样本类型 cDNA 扩增反应循环数”设置 PCR 循环数。
 - 对于细胞系样本（投入 20000），建议采用 13 ~ 14 个循环数。
 - 对于 PBMC 样本（投入 20000），建议采用 17 个循环。
 - 针对实体组织来源的细胞和细胞核（投入 20000），根据样本情况采用 16 ~ 18 个循环。

 停止点 cDNA 产物在 4 $^{\circ}$ C 条件下最多保存 24 h，在 -20 $^{\circ}$ C 条件下最多保存 1 周。

7.3 cDNA 产物及 Oligo 产物筛选

 提示 操作前请仔细阅读第 41 页“关于 DNA Clean Beads 及纯化”。

操作步骤如下：


- 将 2 管 PCR 产物瞬时离心，置于磁力架上 3 ~ 5 min，每管取 95 μ L 上清，合并 2 管到 1 个新的 1.5 mL 离心管中，共计 190 μ L。
- 用移液器吸取体积 114 μ L (0.6 \times) DNA Clean Beads 至 PCR 产物中，并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。
- 室温孵育 10 min。
- 瞬时离心后，将离心管置于磁力架上，静置 2 ~ 5 min，至液体澄清。
- 将上清转移到一个新的 1.5 mL 离心管中，标记为 Oligo 产物 1。将上一步骤中吸附的磁珠继续下一步骤的纯化。

 提示 此步保留上清，切勿丢弃上清。

6. 保持离心管在磁力架上，加入 500 μL 新鲜配制的 80% 乙醇，漂洗磁珠及管壁，静置 30 s，弃掉上清。
7. 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。
8. 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。

9. 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。
10. 室温下孵育 5 min。
11. 瞬时离心后，将离心管置于磁力架上，静置 2 ~ 5 min 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。
12. 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。

 停止点 纯化产物可在 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下保存 6 个月。

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

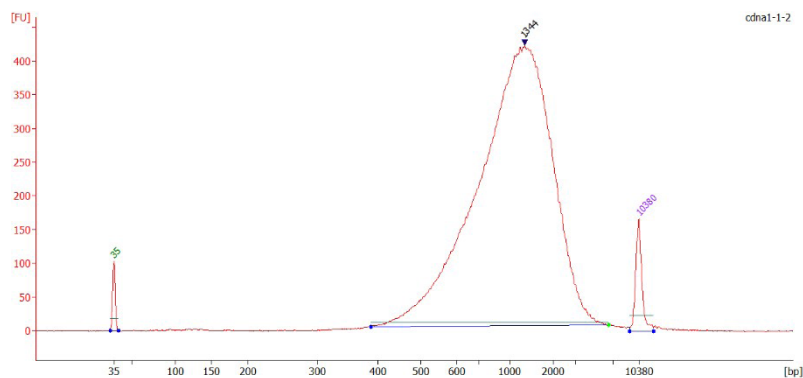


图 11 cDNA产物片段分布图（使用2100片段分析仪检测参考图）

13. 向步骤 5 留存的 Oligo 产物 1 中加入体积 152 μL (0.8 \times) DNA Clean Beads，并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。
14. 室温下孵育 5 min。瞬时离心后，将离心管置于磁力架上，静置 2 ~ 5 min 至液体澄清。弃掉上清。
15. 保持离心管在磁力架上，加入 500 μL 新鲜配制的 80% 乙醇，漂洗磁珠及管壁，静置 30 s，小心弃掉上清。
16. 重复上一步，尽量完全弃掉管内液体。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。
17. 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。

18. 将离心管从磁力架上取下，加入 32 μL NF Water 洗脱 Oligo 产物，用移液器轻轻吹吸至完全混匀。
19. 室温下孵育 5 min。
20. 瞬时离心后，将离心管置于磁力架上，静置 2 ~ 5 min 至液体澄清，将 30 μL 上清液转移到新的 1.5 mL 离心管中，标记为 Oligo 产物 2。
21. 取 1 μL Oligo 产物 2 使用 Qubit dsDNA HS Assay Kit 检测浓度。

参考值：Oligo 产物浓度大于 5 ng/ μL 。

II 停止点 纯化产物可在 -20 $^{\circ}\text{C}$ 条件下保存 6 个月。

第 8 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 标记的过程，用于后续制备成 Oligo 环化文库。耗时约 1 h。

8.1 实验前准备

表 23 试剂准备清单

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 V2.0 (盒 1 液滴生成模块) (货号: 940-000508-00)	DNA Clean Beads	本色	7.19 mL/瓶 ×2

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 V2.0 (盒 3 建库模块) (货号: 940-000510-00)	PCR Amp Enzyme	白色	1.2 mL/管×1
	scRNA Barcode Primer II-1	红色	32 μ L/管×1
	scRNA Barcode Primer II-2	红色	32 μ L/管×1
	scRNA Barcode Primer II-3	红色	32 μ L/管×1
	scRNA Barcode Primer II-4	红色	32 μ L/管×1
	scRNA Barcode Primer II-5	红色	32 μ L/管×1
	scRNA Barcode Primer II-6	红色	32 μ L/管×1
	scRNA Barcode Primer II-7	红色	32 μ L/管×1
	scRNA Barcode Primer II-8	红色	32 μ L/管×1
	scRNA Barcode Primer II-9	红色	32 μ L/管×1
	scRNA Barcode Primer II-10	红色	32 μ L/管×1
	scRNA Barcode Primer II-11	红色	32 μ L/管×1
	scRNA Barcode Primer II-12	红色	32 μ L/管×1
	scRNA Barcode Primer II-13	红色	32 μ L/管×1
	scRNA Barcode Primer II-14	红色	32 μ L/管×1
	scRNA Barcode Primer II-15	红色	32 μ L/管×1
scRNA Barcode Primer II-16	红色	32 μ L/管×1	

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

8.2 Oligo 产物文库构建

操作步骤如下：

1. 取新的 0.2 mL PCR 管，取 8 μ L 第 25 页“cDNA 产物及 Oligo 产物筛选”步骤 20 中的 Oligo 产物 2 进行文库构建。配制体系如下表。

表 24 Oligo 产物文库构建体系

组分	单个反应体积 (μ L)
Oligo 产物 2	8
NF Water	13
scRNA Barcode Primer II-1 ~ scRNA Barcode Primer II-16	4
PCR Amp Enzyme	25
总体积	50


-  提示
- 操作前请仔细阅读第 42 页“关于 *scRNA Barcode Primer II (1-16)* 使用”。
 - 记录下来每个样本加的 *scRNA Barcode Primer II* 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 25 Oligo 产物文库构建反应条件（反应体系 50 μ L）

温度	时间	循环数
105 $^{\circ}$ C (热盖)	On	/
95 $^{\circ}$ C	3 min	1
98 $^{\circ}$ C	20 s	10
62 $^{\circ}$ C	30 s	
72 $^{\circ}$ C	10 s	
72 $^{\circ}$ C	1 min	1
4 $^{\circ}$ C	Hold	/

8.3 Oligo 文库片段筛选

-  提示 操作前请仔细阅读第 41 页“关于 *DNA Clean Beads* 及纯化”。

操作步骤如下：

- 吸取 35 μ L *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 min。
- 瞬时离心后，将 PCR 管置于磁力架上，静置 2 ~ 5 min，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。

- 吸取 35 μ L *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。
- 室温孵育 5 min。
- 瞬时离心后，将 PCR 管置于磁力架上，静置 2 ~ 5 min，至液体澄清，弃掉上清。
- 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 s，弃掉上清。
- 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 min。

12. 瞬时离心后，将 PCR 管置于磁力架上，静置 2 ~ 5 min 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。

 停止点 Oligo 文库可在 -20 $^{\circ}\text{C}$ 条件下保存 1 个月。

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

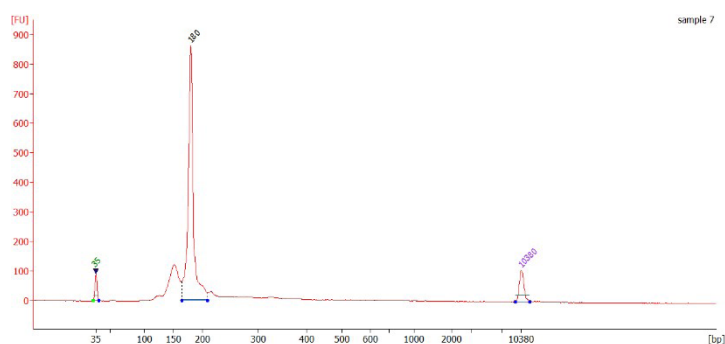


图 12 Oligo文库片段分布图（使用2100片段分析仪检测参考图）

14. Oligo 文库后续直接进行环化文库构建流程。详见第 36 页“环化文库构建（cDNA 文库和 Oligo 文库）”。

第 9 章 cDNA 文库构建操作流程


本章介绍 cDNA 产物制备成单链 DNA 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 h。本章操作无须在超净台中进行。

9.1 实验前准备

表 26 试剂准备清单

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 V2.0 (盒 1 液滴生成模块) (货号: 940-000508-00)	DNA Clean Beads	本色	7.19 mL/ 瓶 ×2

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 V2.0 (盒 3 建库模块) (货号: 940-000510-00)	Frag Enzyme-V2	紫色	80 μ L/ 管 \times 1
	Frag Buffer-V2	紫色	160 μ L/ 管 \times 1
	DNA Ligase-V2	橙色	80 μ L/ 管 \times 1
	Ligation Buffer-V2	橙色	320 μ L/ 管 \times 1
	scRNA Adapter-V2	橙色	80 μ L/ 管 \times 1
	PCR Amp Enzyme	白色	1.2 mL/管 \times 1
	scRNA Barcode Primer II-1	红色	32 μ L/ 管 \times 1
	scRNA Barcode Primer II-2	红色	32 μ L/管 \times 1
	scRNA Barcode Primer II-3	红色	32 μ L/管 \times 1
	scRNA Barcode Primer II-4	红色	32 μ L/管 \times 1
	scRNA Barcode Primer II-5	红色	32 μ L/管 \times 1
	scRNA Barcode Primer II-6	红色	32 μ L/管 \times 1
	scRNA Barcode Primer II-7	红色	32 μ L/管 \times 1
	scRNA Barcode Primer II-8	红色	32 μ L/管 \times 1
	scRNA Barcode Primer II-9	红色	32 μ L/管 \times 1
	scRNA Barcode Primer II-10	红色	32 μ L/管 \times 1
	scRNA Barcode Primer II-11	红色	32 μ L/管 \times 1
scRNA Barcode Primer II-12	红色	32 μ L/管 \times 1	
scRNA Barcode Primer II-13	红色	32 μ L/管 \times 1	
scRNA Barcode Primer II-14	红色	32 μ L/管 \times 1	
scRNA Barcode Primer II-15	红色	32 μ L/管 \times 1	
scRNA Barcode Primer II-16	红色	32 μ L/管 \times 1	

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

9.2 片段化及末端修复

操作步骤如下：

1. 取出 Frag Enzyme-V2，混匀瞬时离心后置于冰上待用。

- 按下表在冰上配制片段化及末端修复反应体系。

表 27 片段化及末端修复体系

组分	单个反应体积 (μL)
Frag Buffer-V2	10
Frag Enzyme-V2	5
总体积	15

- 根据 cDNA 产物浓度，取 150 ng 第七章中纯化后的 cDNA 产物（不足 150 ng 时，取全部 30 μL cDNA 产物）于 0.2 mL PCR 管中，使用 NF Water 补至体积到 45 μL，将 PCR 管置于冰盒上。
- 用移液器吸取 15 μL 配制好的片段化及末端修复反应体系加入上一步骤的 PCR 管中，涡旋振荡至完全混匀，瞬时离心将反应体系收集至管底。
- 当 PCR 仪降至 4 °C，将步骤 4 所述 PCR 管置于 PCR 仪。在 PCR 仪的界面上点击【下一步】，进行 30 °C 反应。

表 28 片段化及末端修复反应条件（反应体系 60 μL）

温度	时间
105 °C (热盖)	On
4 °C	Hold
30 °C	9 min
65 °C	20 min
4 °C	Hold

9.3 接头连接

操作步骤如下：

- 按照下表在冰上配制接头连接反应体系。

表 29 接头连接反应体系

组分	单个反应体积 (μL)
Ligation Buffer-V2	20
DNA Ligase-V2	5
scRNA Adapter-V2	5
NF Water	10
总体积	40



-  **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。
- 2. 用移液器缓慢吸取 40 μL 配制好的接头连接反应体系加入第 31 页“片段化及末端修复”步骤 5 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。
- 3. 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。

表 30 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 min
4 $^{\circ}\text{C}$	Hold

-  **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。
- 4. 反应结束后，瞬时离心将反应体系收集至管底。


9.4 接头连接产物纯化及片段筛选


-  **提示** 操作前请仔细阅读第 41 页“关于 DNA Clean Beads 及纯化”。


操作步骤如下：

1. 吸取 100 μL DNA Clean Beads 至第 32 页“接头连接”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。
2. 室温孵育 5 min。
3. 瞬时离心后，将 PCR 管置于磁力架上，静置 2 ~ 5 min，至液体澄清，弃掉上清。
4. 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 s，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 min。
9. 瞬时离心，将 PCR 管置于磁力架上，静置 2 ~ 5 min 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 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 min。
12. 瞬时离心后,将PCR管置于磁力架上,静置 2 ~ 5 min,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 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 min。
15. 瞬时离心后,将 PCR 管置于磁力架上,静置 2 ~ 5 min,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 s,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 min。
21. 瞬时离心,将 PCR 管置于磁力架上,静置 2 ~ 5 min 至液体澄清,将 46 μL 上清转移到新的 0.2 mL PCR 管中。

 停止点 连接产物纯化后可置 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱储存 24 h。

9.5 PCR 扩增

 提示 操作前请仔细阅读第 42 页“关于 scRNA Barcode Primer II (1-16) 使用”。

操作步骤如下:

1. 在第 33 页“接头连接产物纯化及片段筛选”步骤 21 的 PCR 管中加入 4 μL scRNA Barcode Primer II,并记录每个样本加的 scRNA Barcode Primer II 号。
2. 向上一步反应体系中加入 50 μL PCR Amp Enzyme,涡旋振荡至完全混匀,瞬时离心将反应体系收集至管底。

3. 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 31 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 min	1
98 $^{\circ}\text{C}$	20 s	12
58 $^{\circ}\text{C}$	20 s	
72 $^{\circ}\text{C}$	30 s	
72 $^{\circ}\text{C}$	5 min	1
4 $^{\circ}\text{C}$	Hold	/

9.6 PCR 扩增产物筛选

 提示 操作前请仔细阅读第 41 页“关于 DNA Clean Beads 及纯化”。

操作步骤如下：

1. 吸取 55 μL 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。
2. 室温孵育 5 min。
3. 瞬时离心后，将 PCR 管置于磁力架上，静置 2 ~ 5 min，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。

4. 吸取 15 μL 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 min。
6. 瞬时离心后，将 PCR 管置于磁力架上，静置 2 ~ 5 min，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 s，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 min。
12. 瞬时离心，将 PCR 管置于磁力架上，静置 2 ~ 5 min 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。

II 停止点 PCR 扩增双选产物可在 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下保存 6 个月。

参考值：cDNA 文库浓度大于 $10\text{ ng}/\mu\text{L}$ ，片段分布主峰在 350 ~ 550 bp 之间。

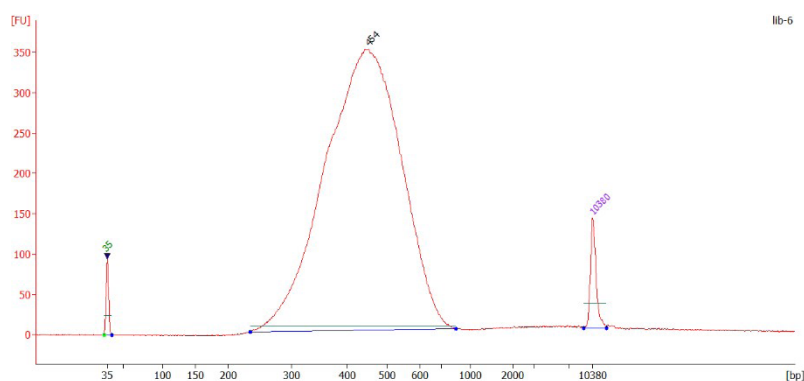


图 13 cDNA文库片段分布图（使用2100片段分析仪检测参考图）

9.7 环化文库构建（cDNA 文库和 Oligo 文库）

- 试剂和耗材准备：

MGIEasy 环化试剂盒（Cat. No. 1000005259）

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。

- 两种文库建议环化投入量如下表，若不足建议量，应重新建库。

表 32 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	300 ng

第 10 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。

10.1 文库结构

文库结构如下图所示。

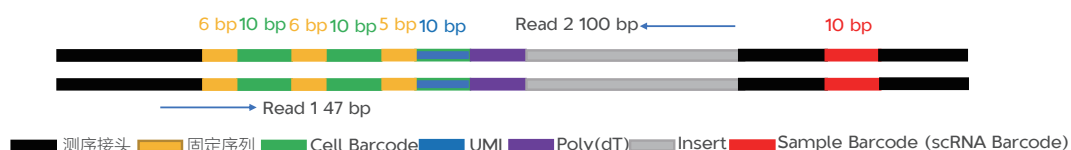


图 14 cDNA文库结构

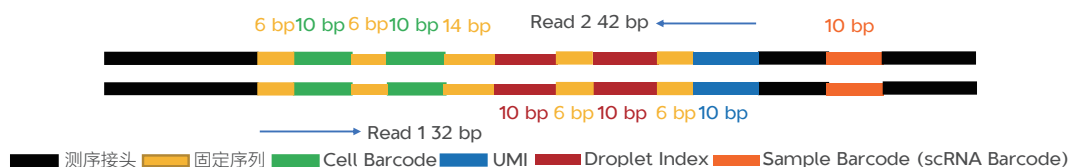


图 15 Oligo文库结构

- 提示**
- 对于 cDNA 文库，使用脚本后产出
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，使用脚本后产出
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)。

10.2 MGISEQ-2000RS 测序平台实验要求

- 仪器、试剂准备：
 - MGISEQ-2000RS 测序仪
 - MGISEQ-2000RS 高通量测序试剂套装 (FCL PE100) (Cat. No. 1000012554)
- 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。

- 两种文库 DNB 投入量和 RCA 时间如下表。


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

表 33 MGISEQ-2000RS DNB 制备要求

文库类型	Make DNB 投入量	RCA 时间
cDNA 文库	10 ng	30 min
Oligo 文库	10 ng	20 min

- 不同文库 Pooling 时，scRNA Barcode Primer II-1 ~ scRNA Barcode Primer II-16 的 Pooling 规则参考第 42 页“关于 scRNA Barcode Primer II (1-16) 使用”。
- 测序参数

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

文库类型	cDNA 文库	Oligo 文库
软件版本	ECR 3.0 及以上版本	ECR 3.0 及以上版本
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 (ECR4.0及以上控制软件版本使用C4_scRNA_BC_PE47+100+10-ECR4.0)	C4_Oligo_BC_PE32+42+10 (ECR4.0 及以上控制软件版本使用 C4_Oligo_BC_PE32+42+10-ECR4.0)
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	> 60 k reads / cell	> 50 M reads / library

表 35 MGISEQ-2000RS 测序软件版本及读长（不混样，不测 Barcode）

文库类型	cDNA 文库	Oligo 文库
软件版本	ECR 3.0 及以上版本	ECR 3.0 及以上版本
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 (ECR4.0及以上控制软件版本使用C4_scRNA_noBC_PE47+100-ECR4.0)	C4_Oligo_noBC_PE32+42 (ECR4.0及以上控制软件版本使用 C4_Oligo_noBC_PE32+42-ECR4.0)
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	/	/
测序深度	> 60 k reads / cell	> 50 M reads / library

10.3 DNBSEQ-T7RS 测序平台实验要求

- 仪器、试剂准备：
 - DNBSEQ-T7RS 测序仪
 - DNBSEQ-T7RS 高通量测序试剂套装（FCL PE100）（Cat. No. 1000016105）

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。

- 两种文库 DNB 投入量和 RCA 时间如下表。

表 36 DNBSEQ-T7RS DNB 制备要求

文库类型	Make DNB 投入量	RCA 时间
cDNA 文库	10 ng	30 min
Oligo 文库	10 ng	20 min

- 不同文库 Pooling 时，scRNA Barcode Primer II (1-16) 的 Pooling 规则参考第 42 页“关于 scRNA Barcode Primer II (1-16) 使用”。

- 测序参数

表 37 DNBSEQ-T7RS 测序软件版本及读长

文库类型	cDNA 文库	Oligo 文库
软件版本	ECR 3.0 及以上版本	ECR 3.0 及以上版本
控制软件版本	1.3.3.553及以上版本	1.3.3.553及以上版本
Basecall版本	1.4.2.47_Ubuntu 及以上版本	1.4.2.47_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	> 60 k reads / cell	> 50 M reads / library


附录 1 常见样本类型 cDNA 扩增反应循环数

表 38 常见人 / 鼠组织解离细胞 / 细胞核或细胞系样本 cDNA 扩增反应循环数建议


物种	样本类型	细胞投入	建议循环数
人	PBMC	20000	18
	胃癌细胞	20000	18
	肺癌细胞	20000	18
	肾癌细胞	20000	18
	间充质干细胞	20000	13
	K562 细胞	20000	13
	293T 细胞	20000	13
小鼠	脑细胞	20000	18
	脾细胞	20000	18
	肾细胞	20000	18
	脑细胞核	20000	18
	脾细胞核	20000	18
	肾细胞核	20000	18
	心脏细胞核	20000	18
	NIH3T3 细胞	20000	13

附录 2 关于 DNA Clean Beads 及纯化

DNA Clean Beads 使用前注意事项


-  **注意**
- DNA Clean Beads (以下简称“磁珠”)使用前,提前 30 min 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

-  **注意**
- 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 min。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 min，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 3 关于 scRNA Barcode Primer II (1-16) 使用

本试剂套装提供 16 管 scRNA Barcode Primer II [DNBelab C 系列 高通量单细胞 RNA 文库制备试剂盒套装 V2.0 (盒 3 建库模块)]。套装中的 scRNA Barcode Primer II 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，使用时请仔细阅读第 42 页“C-1 scRNA Barcode Primer II 使用规则：”。

-  **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。
 - scRNA Barcode Primer II 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。

C-1 scRNA Barcode Primer II 使用规则：

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

- 第一组：scRNA Barcode Primer II-1 ~ scRNA Barcode Primer II-4 为 1 组碱基平衡 Barcode。
- 第二组：scRNA Barcode Primer II-5 ~ scRNA Barcode Primer II-8 为 1 组碱基平衡 Barcode。


- 第三组: scRNA Barcode Primer II-9 ~ scRNA Barcode Primer II-12 为 1 组碱基平衡 Barcode。
- 第四组: scRNA Barcode Primer II-13 ~ scRNA Barcode Primer II-16 为 1 组碱基平衡 Barcode。

以上共 4 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 scRNA Barcode Primer II 组合方案。

表 39 scRNA Barcode Primer II 使用规则

样本数/ lane	方法 1	方法 2	方法 3	方法 4
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
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
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
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
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

样本数/ lane	方法 1	方法 2	方法 3	方法 4
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
8	4 组 scRNA Barcode Primer II 任选 2 组			
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 scRNA Barcode Primer II。 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 scRNA Barcode Primer II, 并注意按照对应要求加不同组别的 scRNA Barcode Primer II。			

 **提示** 需添加混合 scRNA Barcode Primer II (1-16) 的样本, N 个 scRNA Barcode Primer II 之间要等体积混合成 mix 后再加入样本中。

附录 4 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
客服电话	4000-688-114
技术支持邮箱	MGI-service@mgi-tech.com
网址	www.mgi-tech.com

--- 此页有意留白 ---