

ABcellar Single Cell 3' RNA-seq Lib Prep Kit

RK20390



使用说明书

Version: N18A03v1.1

目录

1. 产品概述.....	1
2. 产品组分.....	2
3. 保存及运输条件	3
4. 其他自备材料	3
5. 实验流程.....	4
6. 操作注意事项	4
7. 文库构建步骤	5
8. 附录	16

1. 产品概述

ABcellar Single Cell 3' RNA-seq Lib Prep Kit (ABclonal, Cat. RK20390) 是一款针对微流控平台定向开发的高效快速的高通量单细胞转录组建库试剂盒。本试剂盒使用的编码微球含有 880000+种分子标签, 可以对不同细胞来源的 mRNA 进行分子标记, 构建适配 Illumina 高通量测序平台的高通量单细胞转录组文库, 获得超 10000 个细胞数的单个细胞表达谱信息。

本试剂盒包含液滴生成、反转录、文库构建试剂模块及液滴生成芯片。试剂盒中的每种试剂都经过了严格的质量控制, 且每一批次的建库 Kit 都经过了建库和上机测序的验证, 保证每一批次的试剂盒性能质量稳定。

2. 产品组分

试剂盒模块	试剂管名称与颜色	4 RXN
ABcellar Single Cell 3' RNA-seq Lib Prep Kit-Set A (RK20391)	 RT Reagent	125 µL
	 Template Switch Oligo	12 µL
	 Reducing Agent	44 µL
	 RT Enzyme	25 µL
	 PCR Master Mix	225 µL
	 cDNA Primers	20 µL
	 Cleanup Buffer	728 µL
ABcellar Single Cell 3' RNA-seq Lib Prep Kit-Set B (RK20392)	 Partitioning Oil	1.6 mL
	 Recovery Agent	500 µL
	 First strand cDNA Clean Beads	35 µL
	 Elution Buffer A	900 µL
	 Elution Buffer B	650 µL
	 AFTMag NGS DNA Clean Beads	1.2 mL
ABcellar Single Cell 3' RNA-seq Lib Prep Kit-Set C (RK20393)	 Gel Beads Mix ¹	80 µL X 4
ABcellar Single Cell 3' RNA-seq Lib Prep Kit-Set D (RK20394)	 FS Pro Enzymes II	40 µL
	 FS Pro Buffer I	20 µL
	 Ligase Enzymes	40 µL
	 FS Pro Ligation Buffer II	100 µL
	 Truncated Adapter	20 µL
	 i501 Primer	10 µL
	 I701 Primer	10 µL
	 i502 Primer	10 µL
	 I702 Primer	10 µL
	 2X PCR Master Mix	100 µL
ABcellar Single Cell Chip Set (RK30150)	GEM Chip	/
	GEM Chip Gasket	/

注 1.  代表管盖颜色；

注 2: Gel Beads Mix 禁止二次冻融，解冻后请转置于 4℃保存。

3. 保存及运输条件

ABcellar Single Cell 3' RNA-seq Lib Prep Kit包含五个package:

货号	名称	储存温度
RK20391	ABcellar Single Cell 3' RNA-seq Lib Prep Kit - Set A	-20°C
RK20392	ABcellar Single Cell 3' RNA-seq Lib Prep Kit - Set B	4°C
RK20393	ABcellar Single Cell 3' RNA-seq Lib Prep Kit - Set C [*]	-20°C
RK20394	ABcellar Single Cell 3' RNA-seq Lib Prep Kit - Set D	-20°C
RK30150	ABcellar Single Cell Chip Set	R.T.

注: RK20393 ABcellar Single Cell 3' RNA-seq Lib Prep Kit - Set C 包含的 Gel Beads Mix, 禁止二次冻融, 解冻后请尽快用完。

4. 其他自备材料

4.1. 液滴生成仪

ABcellar 单细胞建库系统;

4.2. 其他仪器

全自动荧光细胞分析仪 (上海睿钰, Cat. Countstar® Rigel);

PCR 仪 (博日, Cat. GeneExplorer);

掌上离心机 (其林贝尔, Cat. LX-200B)

振荡混匀器 (其林贝尔, Cat. Vortex-6);

4.3. 其他试剂及耗材

80%乙醇 (新鲜配制);

NF Water (Thermo Fisher, Cat. R0582);

Phosphate Buffered Saline (PBS) pH 7.4 (Thermo Fisher, Cat. 10010031 R0582);

UltraPure™ BSA (50 mg/mL) (Thermo Fisher, Cat. AM2616);

200 µL 点样吸头 (Thermo Fisher, Cat. 010-Q);

200 µL 低吸附吸头 (莎斯特, Cat. 70.3031.375);

10 µL 低吸附吸头 (莎斯特, Cat. 30.3010.275);

1.5 mL 离心管 (Axygen, Cat. MCT-150-C-S);

八连管 (Axygen, Cat. PCR-0208-C);

4.4. 文库质控

Qubit 荧光定量仪

ABQubit dsDNA Quantitation Kit (ABclonal, Cat. RK30140);

Agilent high sensitivity DNA Chips (Agilent #5067-4626);

Agilent DNA 1000 chip (Agilent #5067-1504)

5. 实验流程

第 1 天 - 步骤		操作时间
制备细胞悬液		取决于样本类型
试剂准备		20 min
液滴生成 (7.5min)		5 min
反转录 (135 min)	停止点	-
破乳与磁珠纯化		30 min
cDNA 扩增 (90 min)	停止点	5 min
cDNA 纯化	停止点	15 min
手工操作总耗时		75 min
实验总体耗时		5 h 15 min

第 2 天 - 步骤		操作时间
片段化 & 末端修复 & 加 A 尾 (40 min)		5 min
双端筛选		30 min
接头连接 (15 min)	停止点	-
接头连接纯化	停止点	15 min
PCR 扩增 (35 min)	停止点	-
PCR 扩增纯化	停止点	30 min
手工操作总耗时		80 min
实验总体耗时		2 h 50 min

6. 操作注意事项

6.1. 单细胞/细胞核悬液要求

6.1.1. 单个细胞/细胞核需要悬浮在含有 BSA (0.04%) 的 1X DPBS 溶液中，单细胞 / 核悬液最适的上样浓度为 500 ~ 1500 细胞/ μ l；

6.1.2. 细胞投入量：测试表明投入 3000-20000 细胞，回收率为~50%。投入 ~3000 细胞时，双包率约 1.1%；投入 ~10000 细胞时，双包率约 4.3%；投入 ~20000 细胞时，双包率约 6.4%。若进一步提高上样量，会导致双包率过高。若想回收更多细胞，建议做平行文库，以降低一次性投入量过多而导致的双包率过高问题；

6.1.3. 单细胞测序实验需要单细胞悬浮液作为样品输入，单细胞悬液的质量对数据结果具有决定性的影响。实验时应最大限度地减少样品中的死细胞、细胞聚集体、非细胞核酸和潜在的反转录抑制剂对获取高质量数据的影响。死细胞和细胞碎片会严重降低数据质量。样本的细胞活性低至 85% 开始对数据质量造成显著影响，推荐进行去死细胞操作。此外，

细胞聚集体还可能导致芯片堵塞，造成液滴生成失败，推荐使用40-50 μm 孔径的滤网过滤，成团率 <1%，无大于 40 μm 的细胞碎片或其他颗粒物；

6.2. 液滴生成注意事项

- 6.2.1. 一些塑料耗材可能会与液滴相互作用并破坏其稳定性。因此，推荐使用经过验证的塑料耗材进行液滴生成反应。该试剂盒已验证 Axygen 八联管 (PCR-0208-C) 和莎斯特低吸附移液器吸头 (70.3031.375, 30.3010.275) 可作为液滴反应的兼容塑料。替换这些材料可能对液滴内的反应性能产生不利影响；
- 6.2.2. ABcellar Single Cell Chip Set 是微流控芯片，引入微粒可能会发生管道堵塞。因此尽量减少试剂、芯片和垫圈等与纤维源的接触，避免耗材重复使用并保持实验室环境清洁；
- 6.2.3. 制备和处理试剂预混液时，确保 Partitioning Oil 需用封口膜封紧，防止蒸发；
- 6.2.4. 确保试剂在使用前完全解冻并充分混合。所有酶在配置期间将组分和预混液置于冰上，使用结束后即刻放置于其存储温度下；
- 6.2.5. 在冰上配制 Master Mix 并保持冷却，直到 ABcellar Single Cell Chip Set 加载；

6.3. 编码微球使用注意事项

- 6.3.1. 切勿将 ABcellar Single Cell 3' Gel Beads Mix 保存至 -80 $^{\circ}\text{C}$ ；Gel Beads Mix 解冻后请转置 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存，禁止再次放回 -20 $^{\circ}\text{C}$ ，以避免反复冻融影响产品性能；
- 6.3.2. 样本加载至液滴生成芯片，吸取 Gel Beads Mix 时，缓慢移液，避免引入气泡，将移液器吸头留在孔中 5 s 后停止抽吸以让压力达到平衡，保证移取正确体积；
- 6.3.3. 将 Gel Beads Mix 加载至 ABcellar Single Cell Chip Set 中时，将吸头伸至加样孔底部，缓慢排液以确保完全转移。
- 6.3.4. 三个加样孔加样时，均需缓慢加样，避免产生气泡而导致包裹失败；
- 6.3.5. 待芯片被完全加载后，立即开始液滴生成反应；

6.4. 操作规范

- 6.4.1. 处理任何样品类型时，应遵守所有适用的生物危害安全法规。请尽量使用无菌技术、无核酸酶试剂和耗材、宽口径移液管头，尽量通过较少的移液操作以减少细胞损伤。

7. 文库构建步骤

7.1. 单细胞悬液准备

- 7.1.1. 将 ~30 mL 培养基、~8 mL Tryple-Express 溶液放置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴加热；
- 7.1.2. 准备 1X PBS (PH7.4)

Components	Molecular Weight	Concentration (mg/L)	mM
Inorganic Salts			
Potassium Phosphate monobasic (KH_2PO_4)	136.0	144.0	1.058236
Sodium Chloride (NaCl)	58.0	9000.0	155.17241
Sodium Phosphate dibasic ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	268.0	795.0	2.966418

7.1.3. 准备 DPBSB (0.04% BSA, 400 µg/mL), 其中 DPBS 溶液配置如下

Components	Molecular Weight	Concentration (mg/L)	mM
Inorganic Salts			
Potassium Chloride (KCl)	75.0	200.0	2.666667
Potassium Phosphate monobasic (KH ₂ PO ₄)	136.0	200.0	1.4705882
Sodium Chloride (NaCl)	58.0	8000.0	137.93103
Sodium Phosphate dibasic (Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O)	268.0	2160.0	8.059702

方案一：悬浮细胞系

7.1.4. 使用细胞计数板或 Countstar® Rigel 计算细胞浓度；理想情况下，细胞样品浓度为 5×10^5 至 1.5×10^6 /mL，存活率 > 90%；

7.1.5. 将上述装有 2 mL 细胞悬液的离心管置于离心机 300 g, 5 min, 弃上清；

7.1.6. 向各管中加入 1 mL DPBSB, 轻轻吹打 5 次混匀, 使细胞重悬；

7.1.7. 300 g, 5 min, 弃上清；

7.1.8. 重复步骤 7.1.6~7.1.7 一次；

7.1.9. 加入适量 DPBSB 使细胞重悬；

7.1.10. 取 10 µL 台盼蓝染液与 10 µL 细胞悬液充分混合；

7.1.11. 使用细胞计数板或 Countstar® Rigel 计数细胞浓度；

7.1.12. 加入适量 DPBSB, 调整细胞悬液浓度至 1000 个/µL, 冰上放置等待液滴生成实验。

方案二：贴壁细胞系

该指引根据 75 cm² 培养皿为例，需适当调整其他培养皿的试剂体积比例。

7.1.4. 需预先将 ~30 mL 培养基和 ~8 mL Tryple-Express 溶液在 37 °C 水浴锅中加热；

7.1.5. 使用 10 mL 巴氏管沿皿壁边缘吸取上层培养基，弃掉；

7.1.6. 使用 10 mL 巴氏管吸取 1 mL Tryple-Express 溶液加入至上述培养皿中，37 °C 孵育 5 ~ 10 min；

7.1.7. 使用 10 mL 巴氏管吸取 5 mL 培养基加入至上述培养皿中，终止消化反应；

7.1.8. 将上述细胞悬液转移至 15 mL 离心管中；

7.1.9. 吸取 2 mL 培养基清洗培养皿表面，将清洗液一起转移至上述离心管中；

7.1.10. 300 g, 5 min (取决于细胞类型，须严格按照细胞培养流程指定离心力与速度进行)；

7.1.11. 用 10 mL 巴氏管沿管壁缓慢吸取上清弃掉，用 2 mL DPBSB 重悬细胞；

7.1.12. 使用细胞计数板或 Countstar® Rigel 计数细胞浓度，理想情况下，细胞为 5×10^5 至 1.5×10^6 /mL，存活率 > 90%；

7.1.13. 将上述装有 2 mL 细胞悬液的离心管置于离心机 300 g, 5 min, 弃上清；

7.1.14. 向各管中加入 1 mL DPBSB, 轻轻吹打 5 次混匀, 使细胞重悬；

7.1.15.300 g, 5 min, 弃上清;

7.1.16.重复步骤 7.1.14~7.1.15 一次;

7.1.17.加入适量 DPBSB 使细胞重悬;

7.1.18.取 10 μ L 台盼蓝染液与 10 μ L 细胞悬液充分混合;

7.1.19.使用细胞计数板或 Countstar® Rigel 计数细胞浓度;

7.1.20.加入适量 DPBSB, 调整细胞悬液浓度至 1000 个/ μ L, 冰上放置等待液滴生成实验。

注1: DPBS 不含 Ca^{2+} , Mg^{2+} , 二价离子会和 RT 酶有一定的竞争反应;

注2: 如果含有 Ca^{2+} 的话, 会导致细胞聚团和贴壁, 降低包裹性;

注3: BSA 的作用是细胞保护剂, 此外还能防止酶的分解与贴壁;

注4: 悬浮于细胞培养液、组织保护液等其他溶液的细胞样品不可直接用于后续实验, 其他未验证过的细胞悬浮液可能对后续实验造成严重的不利影响。

7.2. 液滴生成与单细胞标记

试剂准备如下:

试剂盒模块	试剂管名称与颜色		备注
ABcellar Single Cell 3' RNA-seq Lib Prep Kit - Set A (RK20391)		RT Reagent	使用前需平衡至室温
		Template Switch Oligo	
		Reducing Agent	
		RT Enzyme	冰上放置, 使用之前涡旋振荡混匀并瞬时离心
ABcellar Single Cell 3' RNA-seq Lib Prep Kit - Set B (RK20392)		Partitioning Oil	使用前需平衡至室温
ABcellar Single Cell 3' RNA-seq Lib Prep Kit - Set C (RK20393)		Gel Beads Mix	
ABcellar Single Cell Chip Set (RK30150)		GEM Chip	
		GEM Chip Gasket	

注: 确保所有试剂在使用前充分融解。

RT Master Mix 准备

7.2.1. 冰上配制 RT Master Mix, 如下表所示。轻轻吹打 15 次混匀, 瞬时离心备用。(此时切勿将单细胞悬液加入至 RT Master Mix !)

试剂	体积
 RT Reagent	25 μ L
 Template Switch Oligo	2.5 μ L
 Reducing Agent	2.5 μ L
 RT Enzyme	5 μ L
总体积	35 μ L

7.2.2. 将上述 Master Mix 于冰盒放置;

7.2.3. 全部准备完毕后, 将 40 μ L DPBSB 重悬的细胞加入配好的 Master Mix, 轻轻吹打混匀, 将最终体积补齐至 75 μ L。

ABcellar Single Cell Chip Set 加载

- 7.2.4. 将芯片卡夹取出，放置于水平台面上，放入一排干净的八联管；
- 7.2.5. 取出密封胶垫和 GEM Chip，并将 ABcellar Single Cell Chip Set 放置于八联管上，并卡紧（若密封胶垫的进气孔为密封状态，请务必将进气孔的凸起撕掉，否则会导致液滴生成失败）；
- 7.2.6. 将 Gel Beads Mix 取出涡旋振荡 10 s，瞬离 3 s，用移液枪吸取 60 μ L Gel Beads Mix，缓慢加入至微流控芯片 #1 入口底部，切勿吹出气泡；
- 7.2.7. 用移液枪吸取已混匀的 70 μ L Cell-RT Mix，缓慢加入至微流控芯片 #2 入口底部，切勿吹出气泡；
- 7.2.8. 用移液枪吸取 250 μ L Partitioning Oil，缓慢加入至微流控芯片 #3 入口；
- 7.2.9. 用移液枪吸取 150 μ L Partitioning Oil，缓慢加入至微流控芯片 #4 入口；

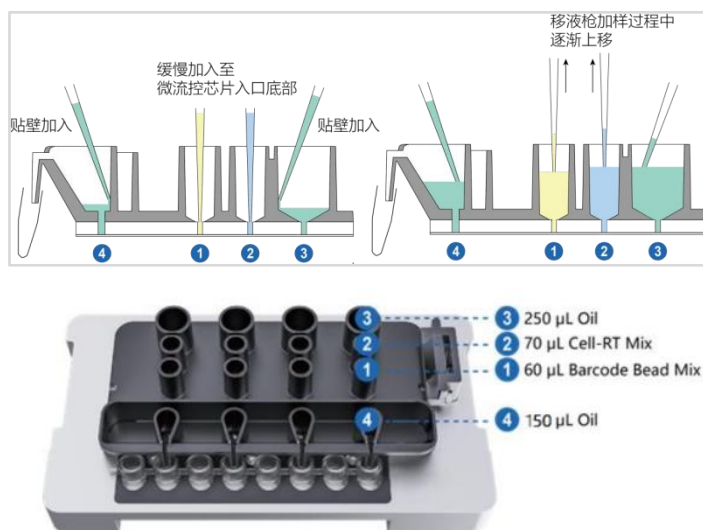


图1. 芯片加样示意图

- 7.2.10. 加样完成后盖上硅胶盖，并确认其与芯片中间无明显缝隙，并立刻运行包裹。芯片加样后，请停留时间不要超过 2 min，停留时间过长可能导致液滴生成失败；

注：未使用样品槽可用于下次单细胞包裹实验。使用前请确认废弃样品槽或未使用样品槽无液体残留。若未使用样品槽已被灰尘、样本或其他试剂污染，请勿使用。

运行单细胞包裹仪

- 7.2.11. 打开 ABcellar 单细胞建库系统开关，开启仪器门；
- 7.2.12. 将已经加载好的芯片连同芯片卡夹一起放置于 ABcellar 单细胞建库系统，确认是否固定；
- 7.2.13. 关闭 ABcellar 单细胞建库系统仪器门，按压启动按钮开始液滴生成反应。

液滴转移

- 7.2.14. 运行结束后，打开液滴生成仪仪器门，将芯片和芯片卡夹一起取出，关闭仪器门；

7.2.15. 丢弃已使用过的芯片和硅胶盖；

7.2.16. 将装有液滴的八联管取出，使用 QSP 010-Q200 μL 吸头小心吸取下层清澈油相（仅保留约 10 μL ）弃掉。若 PCR 管底部 Partitioning Oil 剩余过多，可能导致液滴液面超过 PCR 仪加热孔的深度，导致部分液滴中的逆转录反应失败；



7.2.17. 盖上八联管管盖，冰上放置，转移至 PCR 仪中进行逆转录反应；

7.2.18. 将芯片卡夹收存至下次实验使用。

液滴内逆转录反应

7.2.19. 根据下表设置逆转录反应程序，PCR 仪需预冷，热盖 105 $^{\circ}\text{C}$ ；

温度	时间	Cycles
4 $^{\circ}\text{C}$	∞	-
42 $^{\circ}\text{C}$	90 min	-
50 $^{\circ}\text{C}$	2 min	10
42 $^{\circ}\text{C}$	2 min	
85 $^{\circ}\text{C}$	5 min	反应体积设置 120 μL
4 $^{\circ}\text{C}$	Hold	

7.2.20. 反应结束后，将八联管放置于冰盒上，用于后续破乳与纯化。此处没有停止点，4 $^{\circ}\text{C}$ 放置不超过 24h。

7.3. 破乳、纯化及 cDNA 扩增

试剂准备如下：

试剂盒模块	试剂管名称与颜色		备注
ABcellar Single Cell 3' RNA-seq Lib Prep Kit - Set A (RK20391)	●	Reducing Agent	使用前需平衡至室温
	●	PCR Master Mix	
	●	cDNA Primers	
	●	Cleanup Buffer	
ABcellar Single Cell 3' RNA-seq Lib Prep Kit - Set B (RK20392)	●	Recovery Agent	
	●	First strand cDNA Clean Beads	
	●	Elution Buffer A	
	●	Elution Buffer B	
	●	AFTMag NGS DNA Clean Beads	
其他		80% 酒精	
		无核酸酶水 (NF Water)	

注：确保所有试剂在使用前充分融解，磁珠在使用前需从 4 $^{\circ}\text{C}$ 取出，并于室温平衡至少 15 min。

破乳与纯化

7.3.1. 打开八联管管盖，向液层缓慢滴加 100 μL Recovery Agent，静置 10s。若下层油相和上层水相清晰分层，请继续下一步操作。若油相和水相界面有白色液滴，盖上管盖，将八联管轻轻上下颠倒五次混匀，瞬时离心 10 s；

7.3.2. 用 QSP 010-Q 200 μL 吸头缓慢吸取 110 μL 下层油相，弃掉；

7.3.3. 将 Cleanup Buffer 震荡混匀直至完全溶解（若有白色沉淀析出为正常现象）；

7.3.4. 将 First strand cDNA Clean Beads 震荡混匀，确保磁珠充分悬浮，然后根据下表配制 Clean up Mix I；

	Clean up Mix I	体积
●	Cleanup Buffer	182 μL
●	Reducing Agent	5 μL
●	First strand cDNA Clean Beads	8 μL
	NF Water	5 μL
	总体积	200 μL

7.3.5. 将 Clean up Mix I 吹打混匀小心转移至上述管中，然后上下吹打混匀 15 次，避免吸到底部残留油相和液体溢出，室温孵育 10 min（每 5 min 吹打混匀一次，吹打操作请使用低吸附枪头以减少样品损失）；

7.3.6. 根据下表配制 Elution Solution I，充分混匀备用

	Elution Solution I	体积
●	Elution Buffer A	199 μL
●	Reducing Agent	1 μL
	总体积	200 μL

7.3.7. 孵育结束后，将其放置于磁力架（高位）吸附 2 min，弃上清；

7.3.8. 向管中加入 300 μL 80% 酒精漂洗磁珠，将八联管水平转移到磁力架（低位），吸附 10s 后，再将八联管水平转移磁力架（高位）吸附 30s，弃上清；

7.3.9. 向管中加入 200 μL 80% 酒精漂洗磁珠，将八联管水平转移到磁力架（低位），吸附 10s 后，再将八联管水平转移磁力架（高位）吸附 30s，弃上清；

7.3.10. 孵育 5 s，将其放置于磁力架（低位）吸附 15 s，用 10 μL 吸头吸取多余酒精；

7.3.11. 加入 47 μL Elution Solution I，浸泡 2 min 后使用低吸附枪头上下吹打混匀 15 次，室温静置 5 min；

7.3.12. 将其放置于磁力架（低位）上吸附 2 min，转移 46 μL 上清液至新的八联管中。

cDNA 扩增

7.3.13. 根据下表在冰上配制 cDNA 扩增预混液，最后加入纯化后的 cDNA；

	试剂	体积
●	PCR Master Mix	50 μL
●	cDNA Primers	4 μL
	cDNA	46 μL
	总体积	100 μL

7.3.14. 将上述预混液充分混匀，瞬时离心 10 s 后于冰上放置备用；

7.3.15. 根据下表设置 cDNA 扩增程序（热盖温度 105 $^{\circ}\text{C}$ ）：

温度	时间	Cycles
98°C	3 min	-
98°C	15 s	12-16*
60°C	20 s	
72°C	3 min	
72°C	5 min	-
4°C	Hold	

*：对于 RNA 含量低的样本，可适当增大扩增循环数。不同类型样本扩增循环数参考下表（下表为 10K 细胞上样量推荐的 PCR 循环数，可以根据实际上样量适当调整）：

样本类型	循环数	备注
细胞系	12	-
组织样本	14	-
PBMCs	14	细胞状态好
	15	细胞状态较差

7.3.16.扩增结束后，将产物放置于 4 °C 暂存 24 h 或 -20 °C 不超过 72 h。

cDNA 扩增后纯化

7.3.17.将 AFTMag NGS DNA Clean Beads 充分混匀，吸取 60 μL AFTMag NGS DNA Clean Beads 加入至上述 cDNA 样本中，上下吹打混匀 15 次，室温孵育 5 min；

7.3.18.孵育结束后，将其放置于磁力架（高位）吸附 2 min，弃上清；

7.3.19.向八联管中加入 200 μL 80% 酒精漂洗磁珠，静置 30 s，弃上清；

7.3.20.重复步骤 7.3.19 一次，最后一次尽量弃上清；

7.3.21.脱离 5 s，将其放置于磁力架（低位）吸附 15 s，用 10 μL 吸头吸取多余酒精；

7.3.22.加入 36 μL Elution Buffer B，浸泡 1 min 后上下吹打混匀 15 次，室温静置 5 min；

7.3.23.将其放置于磁力架（低位）上吸附 2 min，小心转移 35 μL 上清液至新的八联管中。

cDNA 质量检测（以 Qubit4.0 & Qsep1 为例）

7.3.24.cDNA 定量：吸取 1 μL 样本，用 Qubit4.0 进行定量；

7.3.25.cDNA 片段大小分析：请使用 Qsep 或 Agilent 2100 等进行 cDNA 片段大小分析。

注：若 cDNA 浓度低于 5ng/μL 即为失败样本。

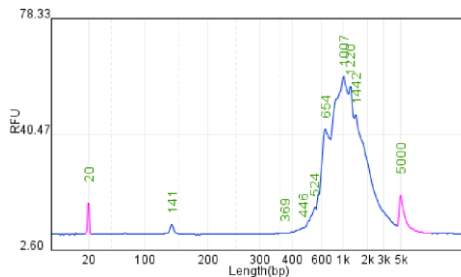


图2. cDNA Qsep 1 片段分析图

7.4. 文库构建

试剂准备如下：

试剂盒模块	试剂管名称与颜色		备注
ABcellar Single Cell 3' RNA-seq Lib Prep Kit - Set B (RK20392)		Elution Buffer B	使用前需平衡至室温
		AFTMag NGS DNA Clean Beads	
ABcellar Single Cell 3' RNA-seq Lib Prep Kit - Set D (RK20394)		FS Pro Enzymes II	冰上放置
		FS Pro Buffer I	使用前需平衡至室温
		Ligase Enzymes	冰上放置
		FS Pro FS Pro Ligation Buffer II	使用前需平衡至室温
		Truncated Adapter	使用前需平衡至室温
		i5xx Primer	
		i7xx Primer	
		2X PCR Master Mix	冰上放置
其他		80% 酒精	
		无核酸酶水 (NF Water)	

注：确保所有试剂在使用前充分融解，磁珠在使用前需从 4 °C 取出，并于室温平衡至少 15 min。

片段化、末端修复及加 A 尾

7.4.1. 将 FS Pro Buffer I、FS Pro Enzymes II 从 -20 °C 冰箱取出，解冻后混匀离心收集至管底，置于冰上备用；

7.4.2. 根据下表在冰上配制片段化、末端修复及加 A 尾的 Master Mix，cDNA 投入量为 50 ng；

试剂	体积
 FS Pro Buffer I	5 µL
 FS Pro Enzymes II	10 µL
cDNA	X µL
NF Water	35-X µL
总体积	50 µL

7.4.3. 充分混匀后瞬时离心，置于冰上备用；

7.4.4. 根据下表设置片段化、末端修复及加 A 尾程序（PCR 仪需预冷，热盖温度 82°C）：

步骤	温度	时间
Hold	4 °C	∞
片段化	32 °C	8 min
末端修复加 A 尾	72 °C	30 min
Hold	4 °C	∞

7.4.5. 将八联管放入 PCR 仪，运行程序，待热盖温度达到设定值，跳过第一节步骤 Hold，进入后续反应程序直至结束；

7.4.6. 反应结束后，将八联管取出，瞬时离心后备用。

双端筛选

7.4.7. 将 AFTMag NGS DNA Clean Beads 取出平衡至室温后，使用前将其充分震荡混匀；

7.4.8. 在上述片段化产物中加入 50 µL NF Water，再加入 60 µL (0.6X) AFTMag NGS DNA Clean Beads。用移液器上下吹打混匀 15 次，室温孵育 5 min（吸取及加入磁珠量时注意加样量是否准确，否则选择片段大小会严重偏离目标大

小)；

7.4.9. 将八联管置于磁力架（高位）上吸附 2 min，吸取上清转移至新的八联管中；

7.4.10.向新八联管中加入 20 μ L (0.2X) AFTMag NGS DNA Clean Beads，用移液器上下吹打混匀 15 次，室温孵育 5 min；

7.4.11.将上述八联管放置于磁力架（高位）上吸附 2 min，弃上清；

7.4.12.保持八联管始终放置于磁力架，向管中加入 200 μ L 新鲜配制的 80% 酒精漂洗，静置 30 s，弃上清；

7.4.13.重复步骤 7.4.12 一次；

7.4.14.瞬离 5 s，将其放置于磁力架（低位）吸附 15 s，用 10 μ L 吸头吸取多余酒精；

7.4.15.将八联管从磁力架上取下，向管中加入 51 μ L Elution Buffer B，浸泡 1 min，用移液器上下吹打混匀 15 次，室温孵育 5 min；

7.4.16.将八联管瞬时离心后，放置于磁力架（低位）上吸附 2 min，用点样枪头吸取 50 μ L 上清液至新的八联管中以进行接头连接。

接头连接

7.4.17.将 FS Pro Ligation Buffer II、Ligase Enzymes、Truncated Adapter 从 -20 $^{\circ}$ C 冰箱取出，解冻后涡旋振荡混匀，瞬时离心，放置于冰盒上备用；

7.4.18.根据下表配制 Adapter Ligation Mix，充分混匀，瞬时离心后置于冰盒备用：

	试剂	体积
	纯化产物（步骤 7.4.16 产物）	50 μ L
●	FS Pro Ligation Buffer II	25 μ L
●	Ligase Enzymes	10 μ L
●	Truncated Adapter	5 μ L
	NF Water	10 μ L
	总体积	100 μ L

7.4.19.根据下表设置 PCR 仪程序，运行程序，待温度达到 4 $^{\circ}$ C，将八联管放置于 PCR 仪，跳过第一节步骤 Hold，进入后续反应程序直至结束；

步骤	温度	时间
Hold	4 $^{\circ}$ C	∞
接头连接	20 $^{\circ}$ C	15 min
Hold	4 $^{\circ}$ C	∞

7.4.20.运行结束后，将接头连接产物从 PCR 仪中取出，用于后续反应。

接头连接后纯化

7.4.21.待 AFTMag NGS DNA Clean Beads 平衡至室温后，将其充分震荡混匀，吸取 80 μ L (0.8X) AFTMag NGS DNA Clean Beads 加入至上述接头连接产物中。用移液器上下吹打混匀 15 次，室温孵育 5 min；

7.4.22.将八联管放置于磁力架（高位）上吸附 2 min，弃上清；

7.4.23.将八联管始终放置于磁力架，向管中加入 200 μ L 新鲜配制的 80% 酒精漂洗，静置 30 s，弃上清；

7.4.24.重复步骤 7.4.23 一次；

7.4.25. 瞬离 5 s，将其放置于磁力架（低位）吸附 15 s，用 10 μ L 吸头吸取多余酒精；

7.4.26. 将八联管从磁力架上取下，向管中加入 21 μ L Elution Buffer B，用移液器吹打混匀 15 次，室温孵育 5 min。（加样操作耗时过久可能导致磁珠暴露于空气时间过长导致磁珠干裂团聚，不易吹散）；

7.4.27. 将八联管瞬时离心后，放置于磁力架（低位）上吸附 2 min，用点样枪头吸取 20 μ L 上清液至新的八联管中，用于后续反应。

文库扩增

7.4.28. 将 2X PCR Master Mix、i5XX Primer、i7XX Primer 从 -20 $^{\circ}$ C 冰箱取出，解冻后涡旋振荡混匀，瞬时离心后置于冰盒上备用；

7.4.29. 根据下表配制文库扩增体系：

试剂		体积
	接头连接产物（步骤 7.4.27 产物）	20 μ L
	2X PCR Master Mix	25 μ L
	i5xx Primer	2.5 μ L
	i7xx Primer	2.5 μ L
	总体积	50 μ L

7.4.30. 根据下表设置文库扩增程序，（PCR 仪需预冷，热盖温度 105 $^{\circ}$ C）：

温度	时间	Cycles
4 $^{\circ}$ C	∞	
98 $^{\circ}$ C	1 min	1
98 $^{\circ}$ C	10 s	
54 $^{\circ}$ C	30 s	14-16*
72 $^{\circ}$ C	30 s	
72 $^{\circ}$ C	1min	1
4 $^{\circ}$ C	Hold	

注：一般设 14 个 cycles，若后续对接测序平台为华大 DNBSEQ-T1/T7 平台，此处可增加 1~2 cycles。

7.4.31. 将八联管放置于 PCR 仪进行反应；

7.4.32. 反应结束后，将八联管从 PCR 仪中取出，用于后续反应。

文库片段选择

7.4.33. 将 AFTMag NGS DNA Clean Beads 取出平衡至室温后，使用前将其充分震荡混匀；

7.4.34. 在文库扩增产物中加入 50 μ L NF Water，再加入 60 μ L (0.6X) AFTMag NGS DNA Clean Beads。用移液器上下吹打混匀 15 次，室温孵育 5 min。（吸取及加入磁珠量时注意加样量是否准确，否则选择片段大小会严重偏离目标大小）；

7.4.35. 将八联管置于磁力架（高位）上吸附 2 min，吸取上清转移至新的八联管中；

7.4.36. 向新八联管中加入 15 μ L (0.15X) AFTMag NGS DNA Clean Beads，用移液器上下吹打混匀 15 次，室温孵育 5 min；

7.4.37. 将上述八联管放置于磁力架（高位）上吸附 2 min，弃上清；

7.4.38.保持八联管始终放置于磁力架，向管中加入 200 μ L 新鲜配制的 80% 酒精漂洗，静置 30 s，弃上清；

7.4.39.重复步骤 7.4.38 一次；

7.4.40.瞬间 5 s，将其放置于磁力架（低位）吸附 15 s，用 10 μ L 吸头吸取多余酒精；

7.4.41.将八联管从磁力架上取下，向管中加入 36 μ L Elution Buffer B，浸泡 1 min，用移液器上下吹打混匀 15 次，室温孵育 5 min（加样操作耗时过久可能导致磁珠暴露于空气时间过长导致磁珠干裂团聚，不易吹散）；

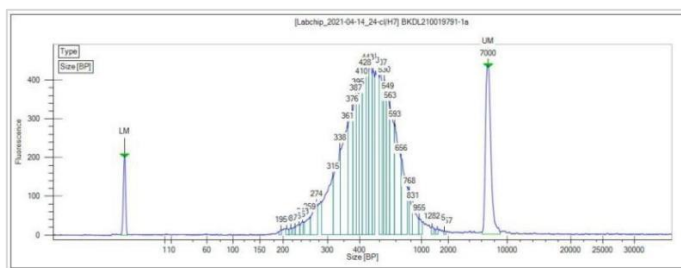
7.4.42.将八联管瞬时离心后，放置于磁力架（低位）上吸附 2min，用点样枪头吸取 35 μ L 上清液至新的八联管中以备质检。

文库质量检测

7.4.43.cDNA 文库定量：吸取 1 μ L 样本，用 Qubit4.0 进行定量

7.4.44.cDNA 文库片段大小检测：请使用 Qsep 或 Agilent 2100 等进行 cDNA 片段大小分析

注：正常文库产量大于 5ng/ μ L，片段主峰在 450bp 左右，呈正态分布。



因表达文库在细胞数量和每个细胞读取深度要求上的差异，文库可以混样测序，但使用相同 index 样本索引的样本不能混样。试剂盒中提供引物 index 信息于下表。若单细胞文库在 Illumina 平台包 lane 上机测序，推荐加入 10% 以上的 PhiX 文库。若和其他类型平衡文库混样测序则不需要单独添加 PhiX 文库。

i7 Index Name	i7 Bases for Sample Sheet	i5 Index Name	i5 Bases for Sample Sheet NextSeq and HiSeq 3000/4000 and Novaseq V1.5	i5 Bases for Sample Sheet HiSeq 2000/2500 and MiSeq
i701 Primer	ATCCACTG	i501 Primer	AGGTGCGT	ACGCACCT
i702 Primer	GCTTGTC A	i502 Primer	GAACATAC	CTATGTTC

若使用华大 DNQSeq-T1/T7 平台测序，则需要送往测序平台环化。

8. 附录

8.1. 关键操作步骤

操作流程中有几个步骤需要额外的注意，是文库构建成功的关键：

- 8.1.1. 将细胞悬液通过合适孔径的细胞滤器过滤细胞，以去除细胞团；
- 8.1.2. 镜检确认单细胞悬液细胞状态是否良好；
- 8.1.3. 将单细胞悬液放在冰盒上，防止细胞团聚或再次建立生长极性；
- 8.1.4. 磁珠纯化步骤中应确认磁珠与水相充分混合。

8.2. 技术细节

除非操作流程中规定了安全停止点，否则应立即进行下一步。指定单独的操作区域：

- 8.2.1. 在指定的无菌区域内进行所有组织和细胞活动，仅限于细胞培养工作；
- 8.2.2. 在特定的环境中进行所有的预 PCR 活动（细胞裂解、标记和扩增制备程序），请勿将 PCR 后的材料或设备在 PCR 前区使用；
- 8.2.3. 关于扩增子控制和生物有害物质处理的预防措施，请参考当地法规。

8.3. 避免交叉污染

- 8.3.1. 当添加或移动样本时，在每个样本之间做好标识，以免混淆样本；
- 8.3.2. 尽量使用带滤芯防气溶胶污染的移液器吸头，以减少试剂污染或样品间交叉污染的风险。

8.4. 编码微球操作

- 8.4.1. 使用低吸附吸头将 Gel Beads Mix 从试剂管转移至各个样品孔；
- 8.4.2. 在室温下使用编码微球；
- 8.4.3. 使用前应旋涡，确认 Gel Beads Mix 分散均匀；
- 8.4.4. 保证移液器体积准确对于操作成功至关重要：1) Gel Beads Mix 具有较高粘性；2) 移液器缓慢地吸取和加入 Gel Beads Mix，使实验中 Barcode Bead 体积足量且避免产生气泡；
- 8.4.5. Gel Beads Mix 分配到样品管之前，须除去吸头尖端外部收集的任何额外液体。缓慢地将 Gel Beads Mix 分配到样品管中，确保整个全部液体已经从吸头尖端分配到样本管中。

8.5. 磁珠清洗

- 8.5.1. 80% 乙醇必须现用现配，乙醇会从空气中吸收水分或挥发，从而影响提取效果；
- 8.5.2. 按要求使用磁力架的高低位，更加有效捕获核酸；
- 8.5.3. 磁吸时，把八联管放在磁力架上，直到管内完全澄清后再操作；
- 8.5.4. 在磁架上不要晃动八联管；
- 8.5.5. 如果磁珠不小心吸进移液器枪头的尖端，将它们分配回磁力架上的管中，等待几分钟，直到液体透明为止；
- 8.5.6. 避免磁珠过分干燥，可能会导致磁珠表面干裂，损失部分 DNA；
- 8.5.7. 涉及吸 cDNA 的步骤，尽量都采用低吸附枪头。

8.6. 细胞样本准备优化指南

8.6.1. 影响细胞制备因素：

- ✧ 胰蛋白酶或替代酶的类型；
- ✧ 胰蛋白酶消化的培养时间和温度；
- ✧ 移液器吹打强度和次数；
- ✧ 使用移液器吸头尖端的直径（可使用宽口枪头以避免细胞转移时的损失或细胞高致死率）；

8.6.2. 细胞上样量的一致性；

8.6.3. 充分悬浮单细胞；

8.6.4. 准确细胞计数；

8.6.5. 高细胞活性（细胞系 > 95%，组织细胞 > 85%）和完整性。

武汉爱博泰克生物科技有限公司

电话：400-999-6126

邮箱：cn.market@abclonal.com

网址：www.abclonal.com.cn

地址：湖北省武汉市江夏区东湖高新区高科园 3 路精准医疗产业基地项目一期 5 号楼