



DNBelab C 系列高通量 单细胞RNA文库制备 试剂盒套装 V3.0 (TaiM 4)

使用说明书

版本:1.0

仅供科研使用

青岛华大智造科技有限责任公司

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 V3.0 (TaiM 4)。说明书版本 1.0。

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。

©2024 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	2024 年 4 月 7 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	11
3.1.1 准备试剂与设备	11
3.1.2 准备样本相悬浮液	11
3.1.3 准备磁珠相悬浮液	12
3.2 进行液滴生成	13

第 4 章 液滴内 RT 反应	18
4.1 实验前准备	18
4.2 进行液滴回收	18

第 5 章 破乳及 RT 产物分选	19
--------------------------	-----------

5.1 实验前准备	20
5.2 进行破乳回收	20
5.3 进行磁珠分选	20
第 6 章 cDNA 中间产物扩增及纯化	22
6.1 实验前准备	22
6.2 进行 cDNA 扩增	22
6.3 cDNA 产物纯化	23
第 7 章 Oligo 产物文库构建操作流程	24
7.1 实验前准备	25
7.2 Oligo 产物文库构建	25
7.3 Oligo 文库片段筛选	26
第 8 章 cDNA 文库构建操作流程	28
8.1 实验前准备	28
8.2 片段化及末端修复	29
8.3 接头连接	30
8.4 接头连接产物纯化及片段筛选	31
8.5 PCR 扩增	32
8.6 PCR 扩增产物筛选	32
8.7 环化文库构建 (cDNA 文库和 Oligo 文库)	34
第 9 章 测序	34
9.1 文库结构	34
9.2 MGISEQ-2000RS 测序平台实验要求	35
9.2.1 实验前准备	35
9.2.2 DNB 制备	35
9.2.3 文库 Pooling	36
9.2.4 测序参数	36
9.3 DNBSEQ-T7RS 测序平台实验要求	37
9.3.1 实验前准备	37
9.3.2 DNB 制备	38

9.3.3 文库 Pooling	38
9.3.4 测序参数	38
附录 1 关于 DNA Clean Beads 及纯化	41
附录 2 关于 Barcode Primer 使用	42
附录 3 制造商信息	44

--- 此页有意留白 ---

第 1 章 产品信息

本章介绍产品基本信息，包括产品描述、适用范围、适配测序平台、试剂盒组分、试剂盒储存条件及有效期、自备物料清单以及注意事项。

1.1 产品描述

DNBelab C 系列单细胞组学研究整体解决方案，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 V3.0(TaiM 4) 使用 MGI 自主设计的 DNBelab C-TaiM 4 液滴生成仪，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（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。本产品采用了液滴内反转录的策略，以及 mRNA 捕获磁珠和液滴识别微珠，可以提高捕获 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

本试剂盒适用于真核生物的高通量单细胞 3'RNA 文库制备，使用前需将样本制备成单细胞（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

本试剂盒套装规格分为 16 反应和 4 反应，均包含 5 个模块，详细信息见下表。

表 1 DNBelab C 系列 高通量单细胞RNA文库制备试剂盒套装 V3.0 (TaiM 4)
(货号: 940-001818-00, 16RXN)

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 V3.0 (盒 1 液滴生成) (货号: 940-001820-00)	Cell Beads-V3	本色	560 μ L/ 管 \times 2 管
	Index Carrier	本色	280 μ L/ 管 \times 2 管
	Lysis Buffer-V3	本色	72 μ L/ 管 \times 2 管
	Breakage Reagent	棕色	800 μ L/ 管 \times 2 管
	P100 Oil	本色	7.6 mL/ 瓶 \times 2 瓶
	Cover Oil	本色	3.2 mL/ 瓶 \times 2 瓶
	DNA Clean Beads	本色	8.352 mL/ 瓶 \times 2 瓶
DNBelab C 系列 高通量单细胞 RNA 文库制备试剂盒套装 V3.0 (盒 2 液滴生成) (货号: 940-001819-00)	Beads Buffer	本色	728 μ L / 管 \times 2 管
	Cell Solution-V3	本色	142 μ L/ 管 \times 2 管
	RT Primer-V3	本色	32 μ L/ 管 \times 2 管
	DIR Regent-V3	本色	13 μ L/ 管 \times 2 管
	RT Enzyme-V3	本色	64 μ L/ 管 \times 2 管
	RNase Inhibitor	本色	32 μ L/ 管 \times 2 管
	cDNA Amp Enzyme	本色	400 μ L/ 管 \times 2 管
	cDNA Amp Primer-V3	本色	32 μ L/ 管 \times 2 管
DNBelab C 系列 高通量单细胞RNA文库制备试剂盒 V3.0 (盒3 文库制备) (货号: 940-001821-00)	Frag Enzyme-V3	本色	80 μ L/ 管 \times 2 管
	Frag Buffer-V3	本色	40 μ L/ 管 \times 2 管
	DNA Ligase-V3	本色	80 μ L/ 管 \times 2 管
	Ligation Buffer-V3	本色	160 μ L/ 管 \times 2 管
	scRNA Adapter-V3	本色	40 μ L/ 管 \times 2 管
	PCR Amp Enzyme	本色	600 μ L/ 管 \times 2 管
DNBelab C系列载片(TaiM 4) (货号: 940-001822-00)	载片	/	16 个 / 盒 \times 1 盒
	密封垫	/	5 件 / 袋 \times 1 袋

试剂盒种类	组分信息	管盖颜色	规格及数量
DNBelab C 系列 单细胞文库制备样本标签试剂盒S (货号: 940-001920-00)	Barcode Primer-1~8	本色	八联排 ×2 组
	Barcode Primer-9~16	本色	八联排 ×2 组
	Barcode Primer-17~24	本色	八联排 ×2 组
	Barcode Primer-25~32	本色	八联排 ×2 组

表 2 DNBelab C 系列 高通量单细胞RNA文库制备试剂盒套装 V3.0 (TaiM 4)
(货号: 940-001924-00, 4RXN)

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 V3.0 (盒 1 液滴生成) (货号: 940-001927-00)	Cell Beads-V3	本色	280 μ L/ 管 ×1 管
	Index Carrier	本色	140 μ L/ 管 ×1 管
	Lysis Buffer-V3	本色	36 μ L/ 管 ×1 管
	Breakage Reagent	棕色	400 μ L/ 管 ×1 管
	P100 Oil	本色	3.8 mL/ 瓶 ×1 瓶
	Cover Oil	本色	1.6 mL/ 瓶 ×1 瓶
	DNA Clean Beads	本色	4.176 mL/ 瓶 ×1 瓶
DNBelab C 系列 高通量单细胞 RNA 文库制备试剂盒套装 V3.0 (盒 2 液滴生成) (货号: 940-001929-00)	Beads Buffer	本色	364 μ L / 管 ×1 管
	Cell Solution-V3	本色	71 μ L/ 管 ×1 管
	RT Primer-V3	本色	16 μ L/ 管 1 管
	DIR Regent-V3	本色	7 μ L/ 管 ×1 管
	RT Enzyme-V3	本色	32 μ L/ 管 ×1 管
	RNase Inhibitor	本色	16 μ L/ 管 ×1 管
	cDNA Amp Enzyme	本色	200 μ L/ 管 ×1 管
DNBelab C 系列 高通量单细胞RNA文库制备试剂盒 V3.0 (盒3 文库制备) (货号: 940-001925-00)	cDNA Amp Primer-V3	本色	16 μ L/ 管 ×1 管
	Frag Enzyme-V3	本色	40 μ L/ 管 ×1 管
	Frag Buffer-V3	本色	20 μ L/ 管 ×1 管
	DNA Ligase-V3	本色	40 μ L/ 管 ×1 管
	Ligation Buffer-V3	本色	80 μ L/ 管 ×1 管
	scRNA Adapter-V3	本色	20 μ L/ 管 ×1 管
PCR Amp Enzyme	本色	300 μ L/ 管 ×1 管	

试剂盒种类	组分信息	管盖颜色	规格及数量
DNBelab C系列 载片(TaiM 4) (货号: 940-001928-00)	载片	/	4 个 / 盒 ×1 盒
	密封垫	/	2 件 / 袋 ×1 袋
DNBelab C 系列 单细胞文库 制备样本标签试剂盒S (货号: 940-001926-00)	Barcode Primer-1~8	本色	八联排 ×1 组
	Barcode Primer-9~16	本色	八联排 ×1 组

1.5 试剂盒储存条件及有效期

表 3 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 V3.0 (盒 1 液滴生成) (货号: 940-001820-00, 16RXN) (货号: 940-001927-00, 4RXN)	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 V3.0 (盒 2 液滴生成) (货号: 940-001819-00, 16RXN) (货号: 940-001929-00, 4RXN)	-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 V3.0 (盒 3 文库制备) (货号: 940-001821-00, 16RXN) (货号: 940-001925-00, 4RXN)	-25 °C ~ -15 °C	-80 °C ~ -15 °C	
DNBelab C 系列 载片 (TaiM 4) (货号: 940-001822-00, 16RXN) (货号: 940-001928-00, 4RXN)	10 °C ~ 30 °C	0 °C ~ 30 °C	
DNBelab C 系列 单细胞文库制备样本标签试剂盒 S (货号: 940-001920-00, 16RXN) (货号: 940-001926-00, 4RXN)	-25 °C ~ -15 °C	-80 °C ~ -15 °C	

-  提示
- 使用干冰运输时，收到产品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 4 自备物料清单

类型	名称	推荐品牌	货号
仪器	DNBelab C-TaiM 4 单细胞液滴生成仪	MGI	900-000637-00
	超净工作台	/	/
	显微镜（针对细胞核，计数需使用荧光显微镜）	/	/
	电子天平	/	/
	漩涡混匀仪	/	/
	微型离心机	/	/
	手动单道移液器： 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： 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	A600332-0005
	0.4%台盼蓝溶液或同等功能的分析试剂	Gibco	15250061
	DAPI (用于细胞核染色)	Sigma-Aldrich	D9542
	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
	MGISEQ-2000RS 高通量测序试剂套装 (FCL PE150)	MGI	1000012555
	DNBSEQ-T7RS 高通量测序试剂套装 (FCL PE100) V2.0	MGI	1000028455
	DNBSEQ-T7RS 高通量测序试剂套装 (FCL PE150) V2.0	MGI	1000028454
	DNBSEQ-T7RS 高通量测序试剂套装 (FCL PE100) V3.0	MGI	940-000269-00
	DNBSEQ-T7RS 高通量测序试剂套装 (FCL PE150) V3.0	MGI	940-000268-00
	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	/	/

类型	名称	推荐品牌	货号
耗材	1 mL 注射器	/	/
	细胞滤网40 μm (独立包装)	/	/
	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	/
	1000 μL / 200 μL / 100 μL / 20 μL / 10 μL 普通低吸附吸头	Axygen	/
	200 μL 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、逆转录、破乳、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 5 样本要求

细胞大小	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、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 6 细胞投入推荐

目的投入细胞数 (个)	推荐细胞浓度 (个/μL)
5000	145 < N < 1000
10000	275 < N < 2000
20000	550 < N < 2000
30000	825 < 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。着重擦拭移液器及实验台操作面。
- 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 分钟，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 分钟。
 - 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：

- PBS (含 10% BSA)

表 7 配制 PBS (含 10% BSA)

试剂名称	用量
BSA 粉末	1 g
PBS (不含 Ca ²⁺ , Mg ²⁺)	定容至 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 -25 °C ~ -15 °C 条件下最多可保存 6 个月。

- PBS (含 0.04% BSA)

表 8 配制 PBS (含 0.04% BSA)

试剂名称	用量
PBS (不含 Ca ²⁺ , Mg ²⁺)	49.8 mL
PBS (含 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

针对细胞系、实体组织等不同的样本，操作步骤如下：

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

 提示

- 推荐使用阔口吸头吹吸混匀细胞样本。
- 用细胞计数板或血球计数板检测细胞浓度，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 V3.0 (TaiM 4) 将细胞（核）悬液制备成液滴。整个过程耗时约 30 分钟。

3.1 实验前准备

3.1.1 准备试剂与设备

表 9 准备清单

类型	试剂盒种类	组分信息	管盖颜色	规格及数量	
				16RXN	4RXN
试剂	DNBelab C 系列 高通量单细胞 RNA 文库制备试剂盒 V3.0 (盒 1 液滴生成) (货号: 940-001820-00, 16RXN) (货号: 940-001927-00, 4RXN)	Cell Beads-V3	本色	560 μ L/ 管 \times 2	280 μ L/ 管 \times 1
		Index Carrier	本色	280 μ L/ 管 \times 2	140 μ L/ 管 \times 1
		Lysis Buffer-V3	本色	72 μ L/ 管 \times 2	36 μ L/ 管 \times 1
		P100 Oil	本色	7.6 mL/ 管 \times 2	3.8 mL/ 管 \times 1
	DNBelab C 系列 高通量单细胞 RNA 文库制备试剂盒 V3.0 (盒 2 液滴生成) (货号: 940-001819-00, 16RXN) (货号: 940-001929-00, 4RXN)	Beads Buffer	本色	728 μ L/ 管 \times 2	364 μ L/ 管 \times 1
		Cell Solution-V3	本色	142 μ L/ 管 \times 2	71 μ L/ 管 \times 1
		RT Primer-V3	本色	32 μ L/ 管 \times 2	16 μ L/ 管 \times 1
		DIR Reagent-V3	本色	13 μ L/ 管 \times 2	7 μ L/ 管 \times 1
		RNase Inhibitor	本色	32 μ L/ 管 \times 2	16 μ L/ 管 \times 1
	DNBelab C 系列载片 (TaiM 4) (货号: 940-001822-00, 16RXN) (货号: 940-001928-00, 4RXN)	载片	/	8 个 / 盒 \times 1	4 个 / 盒 \times 1
		密封垫	/	5 件 / 袋 \times 1	2 件 / 袋 \times 1
	设备	DNBelab C-TaiM 4 液滴生成仪 (货号: 900-000637-00)	/	/	1

-  提示
- 提前取出 P100 Oil 并置于室温平衡至少 30 分钟。
 - 提前将 Lysis Buffer-V3 取出, 室温平衡至溶液中的晶体全部溶解。
 - 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。

3.1.2 准备样本相悬浮液

-  提示 配制体系时应适当增加配液量, 以避免液滴生成时样本相悬浮液加液量不足 80 μ L。

操作步骤如下：

1. 用移液器轻轻吹吸混匀第 10 页“2.3 制备细胞（核）悬浮液”中准备好的细胞（核）悬浮液。按下表配制样本相悬浮液。

表 10 样本相悬浮液体系

组分	单个反应体积 (μL)
Cell Solution-V3	17.7
RT Primer-V3	4
DIR Reagent-V3	1.6
RNase Inhibitor	4
RT Enzyme-V3	8
PBS (含 0.04% BSA)	44.7-X
细胞悬浮液	X
总体积	80



- 提示
- “X”代表细胞（核）悬浮液的体积。
 - 细胞（核）投入总量范围可在 5000~30000，细胞体积最多为 44.7 μL，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。
 - 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。
 - RT Enzyme-V3 和细胞应在即将上液滴生成仪前加入。

2. 样本相悬浮液配制好后，将移液器量程调至 70 μL，轻轻吹吸至完全混匀。
3. 将样本相悬浮液瞬时离心，放置冰上待用。

3.1.3 准备磁珠相悬浮液



- 提示
- 此步骤需在超净台中进行。
 - 为避免液滴生成时磁珠相悬浮液加液量不足 100 μL，应在配制体系时适当增加配液量。

操作步骤如下：

1. 取出 Cell Beads-V3 和 Index Carrier，上下颠倒或吹吸至完全混匀。
2. 吸取单份样本用量 70 μL Cell Beads-V3 以及 35 μL Index Carrier 到 0.2 mL 低吸附 PCR 管中。
3. 将 PCR 管置于磁力架上静置 3~5 分钟，缓慢弃掉上清，避免损失磁珠。
4. 从磁力架上取下 PCR 管，依次加入 91 μL Beads Buffer 和 9 μL Lysis Buffer-V3。
5. 将移液器量程调至 90 μL，轻轻吹吸至完全混匀，瞬时离心，放置冰上待用。

-  提示
- 如果有多个样本需要跑多张载片，可以在一个 1.5 mL 低吸附离心管中合并配制磁珠相悬浮液。
 - 重悬好的磁珠相应在 20 分钟内上液滴生成仪进行液滴生成。

3.2 进行液滴生成

操作步骤如下：

1. 准备载片。

-  警告
- 打开载片包装后请立即使用，避免灰尘掉入载片孔位，造成堵塞。
 - 如载片不慎跌落碎裂，请小心处理，避免划伤。

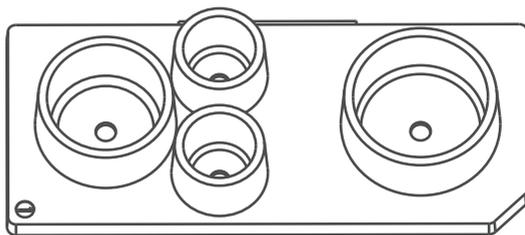


图 1 载片

2. 取出单细胞液滴生成仪。

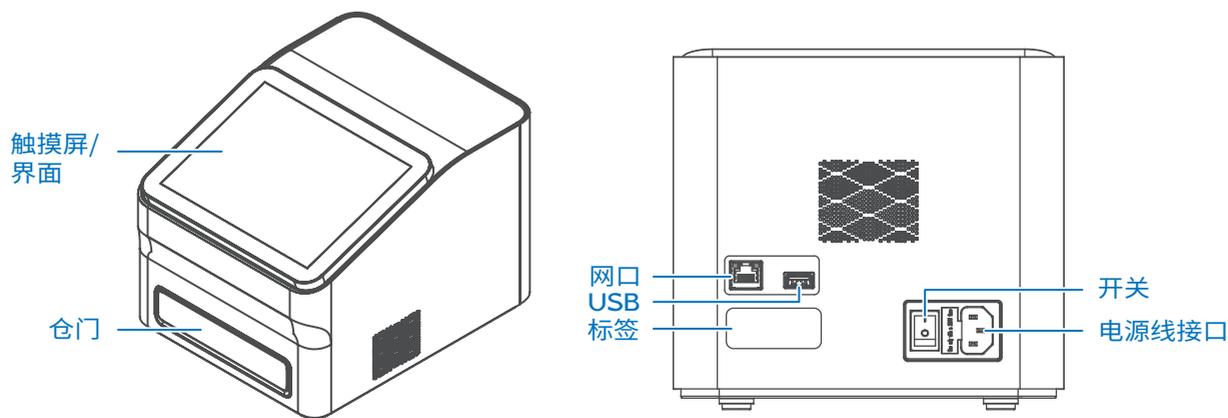


图 2 单细胞液滴生成仪前视图（左）、后视图（右）

3. 打开液滴生成仪电源，点击主界面【开门】，打开载片仓门。

4. 拨开载片载板上的卡扣。

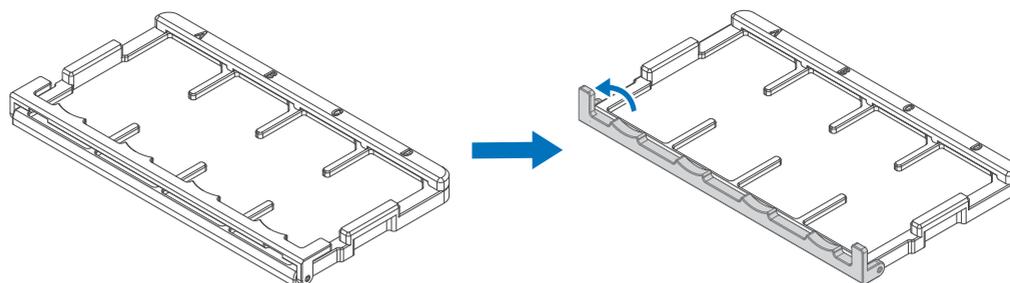


图 3 拨开卡扣

5. 将载片放入载片载板的卡槽中，确保载片右上角的缺口与卡槽右上角的缺口处重合。根据需要依次在其他卡槽中放入载片。

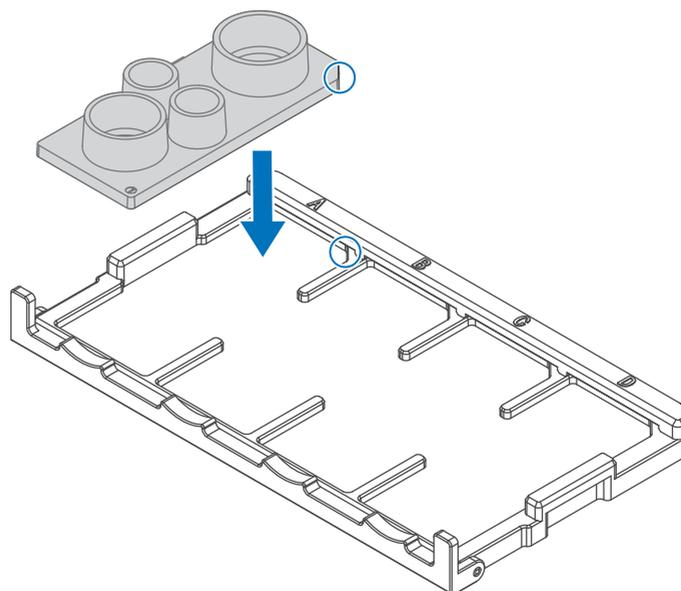


图 4 装载载片

- 将密封垫放在载片收集孔上。可根据装载载片数量自行裁剪所需密封垫的数量。

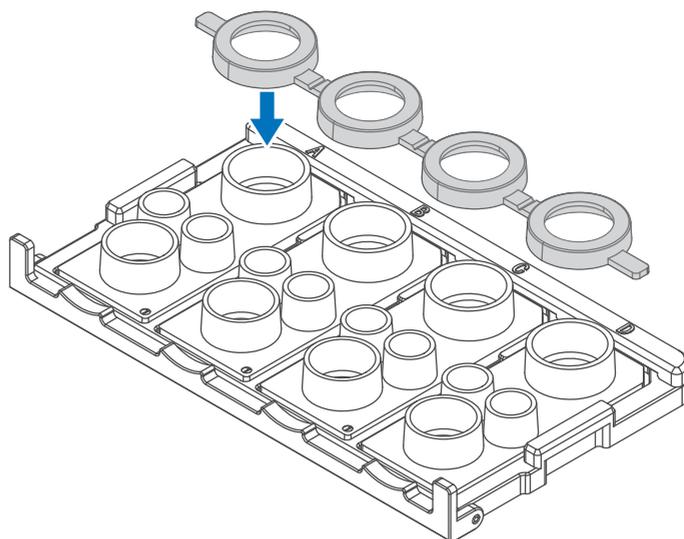


图 5 放置密封垫

 提示 每个载片放置一个密封垫。

- 合上载片载板的卡扣，确保载片固定在载板上。
- 将装有载片的载板放入载片仓的卡槽内。

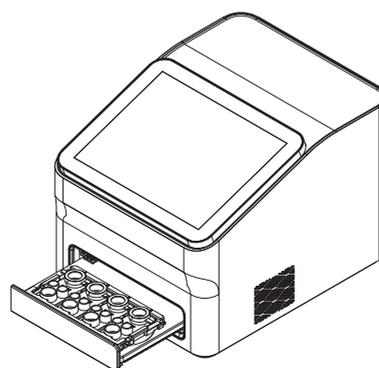


图 6 载片载板放入载片仓

9. 按顺序依次加入样本相悬浮液、P100 Oil、磁珠相悬浮液至相应孔内。

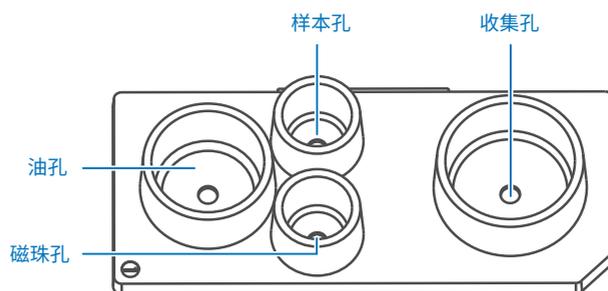


图 7 载片孔位

表 11 载片加液

顺序	溶液	加入量 (μL)	孔位
1	样本相悬浮液	80	样本孔
2	P100 Oil	950	油孔
3	磁珠相悬浮液	100	磁珠孔

-  提示
- 样本相悬浮液和磁珠相悬浮液加样前充分吹打混匀。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 分钟以内。
 - 严格按照先加样本相悬浮液、再加 P100 Oil、最后加磁珠相悬浮液的顺序，否则会造成液滴生成失败。

10. 点击主界面【关门】，关闭载片仓门。

11. 点击反应类型【RNAV3】，点击载片对应的通道，再点击主界面 ，液滴生成反应开始。

 提示 界面中的通道“A、B、C、D”与载片载板中的A、B、C、D”一一对应。



图 8 液滴生成反应开始

12. 反应完成后，在弹框中点击【好的】，再点击主界面【开门】，打开载片仓门。



图 9 液滴生成反应完成

13. 取走密封垫，打开卡扣，取出载片，进行液滴回收。

-  提示
- 液滴生成完成后，应及时进行液滴回收操作，以免因长时间放置在空气中，收集孔中的液滴被蒸干，或者液滴挂在收集孔壁上造成样本损失。
 - 有关单细胞液滴生成仪的维护与保养，详见 *DNBelab C-TaiM 4RS 单细胞液滴生成仪产品说明书*。

第 4 章 液滴内 RT 反应

本章介绍液滴生成结束后回收液滴，进行液滴内 RT 的过程，耗时约 2 小时 40 分钟。

4.1 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	
			16RXN	4RXN
DNBelab C 系列 高通量单细胞 RNA 文库制备试剂盒 V3.0 (盒 1 液滴生成) (货号: 940-001820-00, 16RXN) (货号: 940-001927-00, 4RXN)	Cover Oil	本色	3.2 mL/ 瓶 × 2	1.6 mL/ 瓶 × 1

 提示 提前取出 Cover Oil 并置于室温平衡至少 30 分钟。

4.2 进行液滴回收

操作步骤如下：

1. 取一个干净 PCR 八连管，用马克笔做好标记。

 提示 一个样本对应一个 PCR 八连管。

2. 使用 200 μL 低吸附吸头从载片的收集孔中轻缓吸取全部液滴（可侧倾载片以便收集液滴），吸头悬空垂直静置数秒，等待液滴漂浮至油相上层，轻缓将底部油相打入 PCR 八连管后 4 管，再将液滴转移至 PCR 八连管前 4 管，重复这一步骤，直至转移完全部液滴。

 提示

- PCR 八连管前 4 个管子装载一个样品的全部液滴，后 4 个管子装载 P100 Oil。转移液滴时保持动作轻缓，猛烈地吹打会导致液滴破碎。
- 将一个样品的液滴均匀分装至前 4 个 PCR 管内，每管的体积大约 50 μL ~ 100 μL 。
- 使用 PCR 八连管后 4 管中的油相清洗收集孔中残留液滴（切忌吹吸），并转移至 PCR 八连管前 4 管内，以尽可能回收全部液滴。
- 液滴生成后放置不要超过 30 分钟，否则会影响数据质量。

3. 液滴转移完之后，在 PCR 八连管前 4 管液滴表面加 100 μL Cover Oil 覆盖。

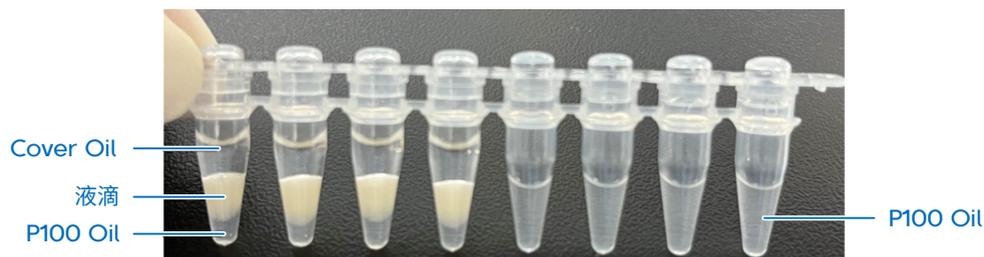


图 10 液滴回收

提示 八连管前 4 管内液体分为 3 层：最上层为 Cover Oil、中间层为液滴、最下层为 P100 Oil（少量或无）。

4. 按下表中的条件在 PCR 仪上开始逆转录反应。

表 13 液滴内 RT 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 分钟	1
50 °C	2 分钟	10
42 °C	2 分钟	
85 °C	5 分钟	1
4 °C	Hold	/

停止点 RT 结束后，可将回收的液滴在 2 °C ~ 8 °C 下放置 24 小时

第 5 章 破乳及 RT 产物分选

本章主要描述破乳回收 RT 产物的过程，耗时约 1 小时。

提示

- 提前取出 DNA Clean Beads，并置于室温平衡至少 30 分钟，涡旋混匀后使用。
- 试剂 Breakage Reagent 应在通风橱内使用。

5.1 实验前准备

表 14 试剂准备清单

试剂盒种类	组分信息	管盖颜色	规格及数量	
			16RXN	4RXN
DNBelab C 系列 高通量单细胞 RNA 文库制备试剂盒 V3.0 (盒 1 液滴生成) (货号: 940-001820-00, 16RXN) (货号: 940-001927-00, 4RXN)	Breakage Reagent	棕色	800 μ L/ 管 \times 2	400 μ L/ 管 \times 1
	DNA Clean Beads	本色	8.352 mL/ 管 \times 2	4.176 mL/ 瓶 \times 1

5.2 进行破乳回收

操作步骤如下：

1. RT 反应结束后，将 PCR 前 4 管中间层的液滴全部转移到干净的新的低吸附 1.5 mL 离心管中。

 提示 转移液滴时避免吸取到上层 Cover Oil，吸到下层 P100 Oil 不会造成影响。

2. 向离心管中先加入 100 μ L Breakage Reagent，再加入 200 μ L NF Water，上下颠倒 15 ~ 20 次，室温静置 3 分钟。

 提示 切勿剧烈振荡。

3. 将离心管 1000 \times g，室温离心 2 分钟。
4. 将离心管置于磁力架上，静置 3~5 分钟。
5. 缓慢吸取 300 μ L 水相至新的低吸附 1.5 mL 离心管中。若吸取的水相体积不足 300 μ L，则用 NF Water 补至 300 μ L。

 提示 吸取水相时保持动作轻缓，避免吸取到下层的油相、中间水油界面层和漂浮在最上层的残留 Cover Oil。

5.3 进行磁珠分选

-  提示
- 提前取出 DNA Clean Beads，并置于室温平衡至少 30 分钟，涡旋混匀后使用。
 - 操作前请仔细阅读第 41 页附录 1 “关于 DNA Clean Beads 及纯化”。

操作步骤如下：

1. 吸取 180 μ L (0.6 \times) DNA Clean Beads 至第 20 页 5.2 “进行破乳回收” 步骤 5 的水相中，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离心管中。

2. 将离心管置于室温孵育 5 分钟。
3. 将离心管瞬时离心并置于磁力架上，静置 2 ~ 5 分钟至液体澄清。
4. 用移液器将上一步的上清转移到新的低吸附 1.5 mL 离心管中，标记为“Oligo 产物 1”；将上一步吸附的磁珠继续下一步的纯化。

 提示

- 此步保留上清，切记不要丢弃上清。
- 注意不要吸到磁珠。

5. 保持离心管在磁力架上，向管中加入 700 μL 新鲜配制的 80% 乙醇，漂洗磁珠及管壁，静置 30 秒，弃掉上清。
6. 重复上一步，尽量吸干管内液体。有少量液体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。
7. 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。

8. 将离心管从磁力架上取下，加入 48 μL NF Water，并用移液器吹吸至完全混匀。
9. 将离心管置于室温下孵育 5 分钟。
10. 将离心管瞬时离心并置于磁力架上，静置 2~5 分钟至液体完全澄清，将 46 μL 上清转移到新的 PCR 管中，标记为“cDNA 中间产物”，进行 cDNA 中间产物扩增及纯化过程。具体操作，参考第 22 页第 6 章“cDNA 中间产物扩增及纯化”。

 停止点 “cDNA 中间产物”可在 -25°C ~ -15°C 条件下保存 1 周。

11. 向步骤 4 留存的“Oligo 产物 1”中，加入 240 μL (0.8 \times) DNA Clean Beads，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离心管中。
12. 将离心管置于室温孵育 5 分钟。
13. 将离心管瞬时离心并置于磁力架上，静置 2 ~ 5 分钟至液体澄清，弃掉上清。
14. 保持离心管在磁力架上，向管中加入 700 μL 新鲜配制的 80% 乙醇，漂洗磁珠及管壁，静置 30 秒，弃掉上清。
15. 重复上一步，尽量吸干管内液体。有少量液体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。
16. 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。

17. 将离心管从磁力架上取下，加入 65 μL NF Water，并用移液器吹吸至完全混匀。
18. 将离心管置于室温下孵育 5 分钟。
19. 将离心管瞬时离心并置于磁力架上，静置 2~5 分钟至液体完全澄清，将 63 μL 上清转移到新的 1.5 mL 离心管中，标记为“Oligo 产物 2”。

 停止点 “Oligo 产物 2”可在 -25°C ~ -15°C 条件下保存 6 个月。

第 6 章 cDNA 中间产物扩增及纯化

本章主要描述cDNA中间产物扩增以及对扩增产物进行纯化的过程。耗时约2小时20分钟。

6.1 实验前准备

表 15 试剂准备清单

试剂盒种类	组分信息	管盖颜色	规格及数量	
			16RXN	4RXN
DNBelab C 系列 高通量单细胞 RNA 文库制备试剂盒 V3.0 (盒 1 液滴生成) (货号: 940-001820-00,16RXN) (货号: 940-001927-00,4RXN)	DNA Clean Beads	本色	8.352 mL/ 瓶 ×2	4.176 mL/ 瓶 ×1
	cDNA Amp Enzyme	本色	400 μL/ 管 ×2	200 μL/ 管 ×1
DNBelab C 系列 高通量单细胞 RNA 文库制备试剂盒 V3.0 (盒 2 液滴生成) (货号: 940-001819-00,16RXN) (货号: 940-001929-00,4RXN)	cDNA Amp Primer-V3	本色	32 μL/ 管 ×2	16 μL/ 管 ×1

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

6.2 进行 cDNA 扩增

操作步骤如下：

- 按下表在冰上配制 cDNA 扩增反应体系。

表 16 cDNA 扩增反应体系

组分	单个反应体积 (μL)
cDNA Amp Enzyme	50
cDNA Amp Primer-V3	4
cDNA 中间产物	46
总体积	100

- 将配制好的反应体系涡旋混匀，并瞬时离心。
- 按下表中的条件在 PCR 仪上开始 cDNA 扩增反应。

表 17 cDNA 扩增反应条件（反应体系 100 μL ）

温度	时间	循环数
105 °C (热盖)	On	/
95 °C	3 分钟	1
98 °C	20 秒	X
65 °C	30 秒	
72 °C	3 分钟	
72 °C	5 分钟	1
4 °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：

- 对于细胞系样本（投入 10000~20000），建议采用 11 ~ 13 个循环。
- 对于 PBMC 样本（投入 10000~20000），建议采用 13 ~ 15 个循环。
- 针对实体组织来源的细胞（核）（投入 10000~20000），根据样本情况采用 15 ~ 20 个循环。



停止点 cDNA 扩增产物在 2 °C ~8 °C 条件下最多保存 24 小时，在 -25 °C ~-15 °C 条件下最多保存 1 周。

6.3 cDNA 产物纯化



- 提示
- 提前取出 DNA Clean Beads，并置于室温平衡至少 30 分钟，涡旋混匀后使用。
 - 操作前请仔细阅读第 41 页附录 1 “关于 DNA Clean Beads 及纯化”。

操作步骤如下：

1. 用移液器吸取体积 60 μL (0.6 \times) DNA Clean Beads 至第 22 页 6.2 “进行 cDNA 扩增” 步骤 3 的 cDNA 扩增产物中。
2. 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。
3. 室温孵育 5 分钟。
4. 瞬时离心后，将 PCR 管置于磁力架上，静置 2~5 分钟，至液体澄清，弃掉上清。
5. 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 秒，弃掉上清。
6. 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。
7. 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。

8. 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。
9. 室温下孵育 5 分钟。
10. 瞬时离心后，将 PCR 管置于磁力架上，静置 2~5 分钟至液体完全澄清，将 30 μL 上清液转移到新的 1.5 mL 离心管中，标记为“cDNA 产物”。
11. 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。

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

 提示 该参考值为使用标准人源 PBMC 测试所得。对于不同类型样本，cDNA 产物浓度可能存在差异。

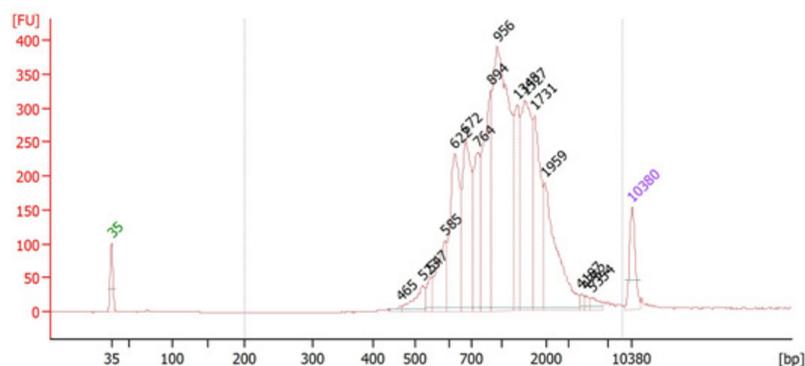


图 11 cDNA产物片段分布图（使用2100片段分析仪检测参考图）

 停止点 纯化产物可在 $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ~ $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下保存 6 个月。

第 7 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，制备成 Oligo 文库的过程。耗时约 1 小时 30 分钟。

7.1 实验前准备

表 18 试剂准备清单

试剂盒种类	组分信息	管盖颜色	规格及数量	
			16RXN	4RXN
DNBelab C 系列 高通量单细胞 RNA 文库制备试剂盒 V3.0 (盒 1 液滴生成) (货号: 940-001820-00,16RXN) (货号: 940-001927-00,4RXN)	DNA Clean Beads	本色	8.352 mL/ 瓶 ×2	4.176 mL/ 瓶 ×1
DNBelab C 系列 高通量单细胞 RNA 文库制备试剂盒 V3.0 (盒 3 文库制备) (货号: 940-001821-00,16RXN) (货号: 940-001925-00,4RXN)	PCR Amp Enzyme	本色	600 μL/ 管 ×2	300 μL/ 管 ×1
DNBelab C 系列 单细胞文库制备样本标签试剂盒 S (货号: 940-001920-00,16RXN)	Barcode Primer-1~8	本色	八联排 ×2 组	/
	Barcode Primer-9~16	本色	八联排 ×2 组	/
	Barcode Primer-17~24	本色	八联排 ×2 组	/
	Barcode Primer-25~32	本色	八联排 ×2 组	/
DNBelab C 系列 单细胞文库制备样本标签试剂盒 S (货号: 940-001926-00,4RXN)	Barcode Primer-1~8	本色	/	八联排 ×1 组
	Barcode Primer-9~16	本色	/	八联排 ×1 组

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

7.2 Oligo 产物文库构建

操作步骤如下:

1. 取新的 0.2 mL PCR 管, 取 10 μL 第 20 页 5.3 “进行磁珠分选” 步骤 19 中的 “Oligo 产物 2” 进行文库构建。配制体系如下表。

表 19 Oligo 产物文库构建体系

组分	单个反应体积 (μL)
Oligo 产物 2	21
Barcode Primer	4
PCR Amp Enzyme	25
总体积	50

-  提示
- 操作前请仔细阅读第 42 页附录 2 “关于 Barcode Primer 使用”。
 - 记录下来每个样本加的 Barcode Primer 号。

2. 将上一步骤中配制好的反应体系涡旋混匀，并瞬时离心。
3. 按下表的条件构建 Oligo 文库。

表 20 Oligo 产物文库构建反应条件（反应体系 50 μL）

温度	时间	循环数
105 °C (热盖)	On	/
95 °C	3 分钟	1
98 °C	15 秒	9
60 °C	30 秒	
72 °C	10 秒	
72 °C	5 分钟	1
4 °C	Hold	/

7.3 Oligo 文库片段筛选

-  提示
- 提前取出 DNA Clean Beads，并置于室温平衡至少 30 分钟，使用前应涡旋混匀。
 - 操作前请仔细阅读第 41 页附录 1 “关于 DNA Clean Beads 及纯化”。

操作步骤如下：

1. 吸取 30 μL (0.6×) 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 分钟。
3. 瞬时离心后，将 PCR 管置于磁力架上，静置 2~5 分钟，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。

4. 吸取 40 μL (0.8 \times) 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。
5. 室温孵育 5 分钟。
6. 瞬时离心后, 将 PCR 管置于磁力架上, 静置 2~5 分钟, 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 秒, 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 分钟。
12. 瞬时离心后, 将 PCR 管置于磁力架上, 静置 2~5 分钟至液体澄清, 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。

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

 提示 该参考值为使用标准人源 PBMC 测试所得。对于不同类型样本, 文库浓度可能存在差异。

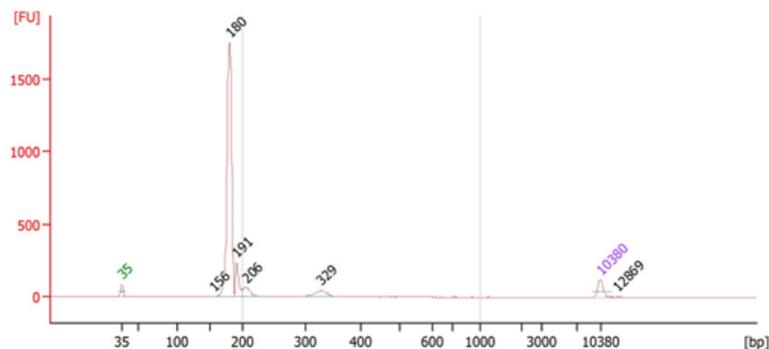


图 12 Oligo文库片段分布图 (使用2100片段分析仪检测参考图)

14. 用 Oligo 文库进行环化文库构建。详见第 34 页“8.7 环化文库构建 (cDNA 文库和 Oligo 文库)”。

 停止点 Oligo 文库可在 $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ~ $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下保存 6 个月。

第 8 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 小时 15 分钟。

 提示 本章操作无须在超净台中进行。

8.1 实验前准备

表 21 试剂准备清单

试剂盒种类	组分信息	管盖颜色	规格及数量	
			16RXN	4RXN
DNBelab C 系列 高通量单细胞 RNA 文库制备试剂盒 V3.0 (盒 1 液滴生成) (货号: 940-001820-00,16RXN) (货号: 940-001927-00,4RXN)	DNA Clean Beads	本色	8.352 mL/ 瓶 ×2	4.176 mL/ 瓶 ×1
	Frag Enzyme-V3	本色	80 μL/ 管 ×2	40 μL/ 管 ×1
DNBelab C 系列 高通量单细胞 RNA 文库制备试剂盒 V3.0 (盒 3 文库制备) (货号: 940-001821-00,16RXN) (货号: 940-001925-00,4RXN)	Frag Buffer-V3	本色	40 μL/ 管 ×2	20 μL/ 管 ×1
	DNA Ligase-V3	本色	80 μL/ 管 ×2	40 μL/ 管 ×1
	Ligation Buffer-V3	本色	160 μL/ 管 ×2	80 μL/ 管 ×1
	scRNA Adapter-V3	本色	40 μL/ 管 ×2	20 μL/ 管 ×1
	PCR Amp Enzyme	本色	600 μL/ 管 ×2	300 μL/ 管 ×1
DNBelab C 系列 单细胞文库制备样本标签试剂盒 S (货号: 940-001920-00,16RXN)	Barcode Primer-1~8	本色	八联排 ×2 组	/
	Barcode Primer-9~16	本色	八联排 ×2 组	/
	Barcode Primer-17~24	本色	八联排 ×2 组	/
	Barcode Primer-25~32	本色	八联排 ×2 组	/

试剂盒种类	组分信息	管盖颜色	规格及数量	
			16RXN	4RXN
DNBelab C 系列 单细胞文库制备样本标签试剂盒 S (货号: 940-001926-00,4RXN)	Barcode Primer-1~8	本色	/	八联排 ×1 组
	Barcode Primer-9~16	本色	/	八联排 ×1 组

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

8.2 片段化及末端修复

操作步骤如下：

1. 取出 Frag Enzyme-V3，混匀瞬时离心后置于冰上待用。
2. 按下表在冰上配制片段化及末端修复反应体系。

表 22 片段化及末端修复体系

组分	单个反应体积 (μL)
Frag Buffer-V3	5
NF Water	25
cDNA 产物	10
总体积	40

 提示 cDNA 产物最大投入量为 800 ng；若 cDNA 产物浓度 >80 ng/μL，则按 800 ng 投入，后用 NF Water 补齐体系。

3. 用移液器吸取 10 μL Frag Enzyme-V3 加入步骤 2 的 PCR 管中。
4. 涡旋振荡至完全混匀，瞬时离心将反应体系收集至管底。
5. 当 PCR 仪降至 4 °C，将步骤 4 所述 PCR 管置于 PCR 仪。按照下表的条件进行反应。

表 23 片段化及末端修复反应条件（反应体系 50 μL ）

温度	时间
70 °C（热盖）	On
4 °C	1 分钟
32 °C	10 分钟
65 °C	30 分钟
4 °C	Hold

8.3 接头连接

操作步骤如下：

1. 按照下表在冰上配制接头连接反应体系。

表 24 接头连接反应体系

组分	单个反应体积 (μL)
Ligation Buffer-V3	20
DNA Ligase-V3	10
scRNA Adapter-V3	5
NF Water	15
总体积	50



- 提示
- 接头连接反应体系较粘稠，操作时请慢慢吸慢慢放，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 50 μL 配制好的接头连接反应体系加入第 29 页“8.2 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。



- 提示 此步反应关闭热盖模式，若热盖温度高于 25 °C，可打开 PCR 仪盖进行反应。

表 25 接头连接反应条件（反应体系 100 μL ）

温度	时间
热盖	Off
20 °C	15 分钟
4 °C	Hold

4. 反应结束后，瞬时离心将反应体系收集至管底。

8.4 接头连接产物纯化及片段筛选

-  提示
- 提前取出 DNA Clean Beads，室温平衡至少 30 分钟，使用前应涡旋混匀。
 - 操作前请仔细阅读第 41 页附录 1 “关于 DNA Clean Beads 及纯化”。

操作步骤如下：

1. 吸取 100 μL (1 \times) DNA Clean Beads 至第 30 页“8.3 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 分钟。
3. 瞬时离心后，将 PCR 管置于磁力架上，静置 2 ~ 5 分钟，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 秒，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 分钟。
9. 瞬时离心，将 PCR 管置于磁力架上，静置 2 ~ 5 分钟至液体澄清，将 100 μL 上清转移到新的 0.2 mL PCR 管中。
10. 吸取 55 μL (0.55 \times) 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 分钟。
12. 瞬时离心后，将 PCR 管置于磁力架上，静置 2 ~ 5 分钟，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 (0.15 \times) 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 分钟。
15. 瞬时离心后，将 PCR 管置于磁力架上，静置 2 ~ 5 分钟，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 秒，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 分钟。
 21. 瞬时离心，将 PCR 管置于磁力架上，静置 2 ~ 5 分钟至液体澄清，将 46 μL 上清转移到新的 0.2 mL PCR 管中。
- II** 停止点 连接产物纯化后可置 $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ~ $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱储存 24 小时。

8.5 PCR 扩增

提示 操作前请仔细阅读第 42 页附录 2 “关于 Barcode Primer 使用”。

操作步骤如下：

1. 在第 31 页“8.4 接头连接产物纯化及片段筛选”步骤 21 的 PCR 管中加入 4 μL Barcode Primer，并记录每个样本加的 Barcode Primer 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 26 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 分钟	1
98 $^{\circ}\text{C}$	20 秒	12
58 $^{\circ}\text{C}$	20 秒	
72 $^{\circ}\text{C}$	30 秒	
72 $^{\circ}\text{C}$	5 分钟	1
4 $^{\circ}\text{C}$	Hold	/

8.6 PCR 扩增产物筛选

提示

- 提前取出 DNA Clean Beads，室温平衡至少 30 分钟，使用前应涡旋混匀。
- 操作前请仔细阅读第 41 页附录 1 “关于 DNA Clean Beads 及纯化”。

操作步骤如下：

1. 吸取 55 μL (0.55 \times) 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 分钟。

3. 瞬时离心后,将PCR管置于磁力架上,静置2~5分钟,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 (0.15 \times) 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分钟。
6. 瞬时离心后,将PCR管置于磁力架上,静置2~5分钟,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秒,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分钟。
12. 瞬时离心,将PCR管置于磁力架上,静置2~5分钟至液体澄清,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。

参考值: cDNA文库浓度大于10 ng/ μL ,片段分布在350~550 bp之间。

 提示 该参考值为使用标准人源PBMC测试所得。对于不同类型样本,文库浓度可能存在差异。

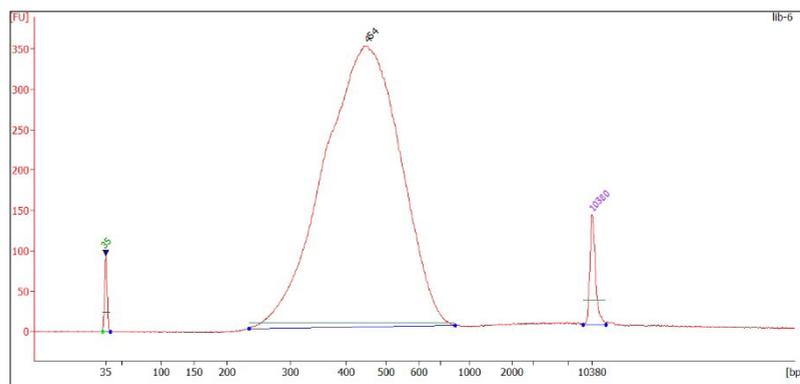


图 13 cDNA文库片段分布图 (使用2100片段分析仪检测参考图)

 停止点 cDNA文库可在-25 $^{\circ}\text{C}$ ~-15 $^{\circ}\text{C}$ 条件下保存6个月。

8.7 环化文库构建 (cDNA 文库和 Oligo 文库)

操作步骤如下：

1. 取出 MGIEasy 环化试剂盒进行环化文库的构建。

 提示 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。

2. 两种文库建议环化投入量如下表，若不足建议量，可将多样本 Pooling (建议最多 4 个文库) 后进行环化或者重新建库。

表 27 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	400 ng

第 9 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。

 提示 MGI 的单细胞 scATAC 文库不能和 MGI 的 APP 系列转换接头试剂盒转化的文库进行同载片或者同 Lane pooling 测序。

9.1 文库结构

文库结构如下图所示。

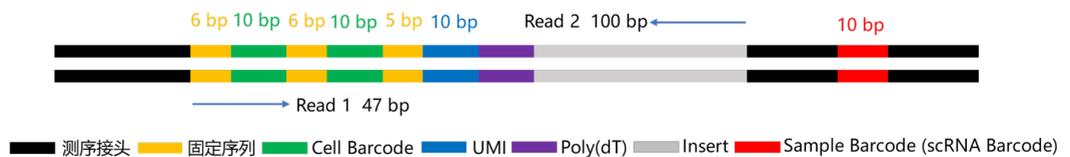


图 14 cDNA文库结构

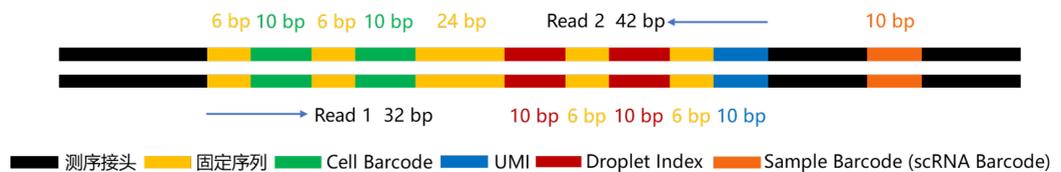


图 15 Oligo文库结构

-  提示
- 对于 cDNA 文库，测序读长：
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，测序读长：
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) 。

9.2 MGISEQ-2000RS 测序平台实验要求

9.2.1 实验前准备

-  提示 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。

种类	型号	货号
测序仪	MGISEQ-2000RS 测序仪	/
测序试剂套装	MGISEQ-2000RS 高通量测序试剂套装 (FCL PE100)	1000012554
	MGISEQ-2000RS 高通量测序试剂套装 (FCL PE150)	1000012555

9.2.2 DNB 制备

按下表制备 DNB:

-  提示 如果需要 pooling 测序，建议先将不同样本 pooling 之后再制备 DNB。

表 28 MGISEQ-2000RS DNB 制备要求

测序试剂	PE100/PE150	
文库类型	cDNA 文库	Oligo 文库
Make DNB 投入量	10 ng	6 ng
RCA 时间	20 分钟	20 分钟

-  提示 若 cDNA 环化文库不足 10 ng，可将 ssDNA 文库的投入量调整为 6 ng，RCA 时间调整为 26 分钟制备 DNB。

9.2.3 文库 Pooling

不同文库 Pooling 时, Barcode Primer 的 Pooling 规则参考第 42 页附录 2 “关于 Barcode Primer 使用”。

9.2.4 测序参数

表 29 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	ECR 4.0	ECR 6.0	ECR7.0	ECR 3.0	ECR 4.0	ECR 6.0	ECR7.0
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	C4_scRNA_BC_PE47+100+10-ECR4.0	Z_C4_scRNA_BC-ECR6.0	自定义	C4_Oligo_BC_PE32+42+10	C4_Oligo_BC_PE32+42+10-ECR4.0	Z_C4_Oligo_BC-ECR6.0	自定义
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	>50 k Reads/cell				> 50 M reads / library			

表 30 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	ECR 4.0	ECR 6.0	ECR7.0	ECR 3.0	ECR 4.0	ECR 6.0	ECR7.0
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	C4_scRNA_ noBC_ PE47+ 100- ECR4.0	Z_C4_ scRNA_ noBC- ECR6.0	自定义	C4_Oligo_ noBC_ PE32+42	C4_Oligo_ noBC_ PE32+42- ECR4.0	Z_C4_ Oligo_ noBC- ECR6.0	自定义
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	>50 k Reads/cell				> 50 M reads/library			

9.3 DNBSEQ-T7RS 测序平台实验要求

9.3.1 实验前准备

 提示 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。

种类	型号	货号
测序仪	DNBSEQ-T7RS 测序仪	/
测序试剂套装	DNBSEQ-T7RS 高通量测序试剂套装 (FCL PE100) V2.0	1000028455
	DNBSEQ-T7RS 高通量测序试剂套装 (FCL PE100) V3.0	940-000269-00
	DNBSEQ-T7RS 高通量测序试剂套装 (FCL PE150) V2.0	1000028454
	DNBSEQ-T7RS 高通量测序试剂套装 (FCL PE150) V3.0	940-000268-00

9.3.2 DNB 制备

按下表制备 DNB:

表 31 DNBSEQ-T7RS DNB 制备要求

测序试剂	PE100		PE150	
文库类型	cDNA 文库	Oligo 文库	cDNA 文库	Oligo 文库
Make DNB 投入量	10 ng	6 ng	10 ng	6 ng
RCA 时间	20 分钟	20 分钟	10 分钟	10 分钟

-  提示
- 当使用 PE100 V2.0 测序套装时, 若 cDNA 环化文库不足 10 ng, 可将 sscDNA 文库投入量调整为 6 ng, RCA 时间调整为 26 分钟制备 DNB。
 - 当使用 PE150 V2.0 测序套装时, 若 cDNA 环化文库不足 10 ng, 可将 sscDNA 文库投入量调整为 6 ng, RCA 时间调整为 20 分钟制备 DNB。

9.3.3 文库 Pooling

不同文库 Pooling 时, Barcode Primer 的 Pooling 规则参考第 42 页附录 2 “关于 Barcode Primer 使用”。

9.3.4 测序参数

表 32 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	>50 k Reads/cell	>50 M reads / library

-  提示
- 当使用 DNBSEQ-T7RS 高通量测序试剂套装 V2.0 版本试剂盒时，测序软件版本应为 ECR3.0 及以上版本。
 - 当使用 DNBSEQ-T7RS 高通量测序试剂套装 V3.0 版本试剂盒时，测序软件版本应为 ECR4.0 及以上版本。

--- 此页有意留白 ---

附录 1 关于 DNA Clean Beads 及纯化

DNA Clean Beads 使用前注意事项

- DNA Clean Beads（以下简称“磁珠”）使用前，提前 30 分钟从 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。
- 磁珠使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

- 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 分钟。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 分钟，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 2 关于 Barcode Primer 使用

本试剂套装根据反应规格不同，分别提供 16 种或者 32 种 Barcode Primer 【DNBelab C 系列 单细胞文库制备样本标签试剂盒 S】（货号：940-001920-00，32 种；货号：940-001926-00，16 种）。套装中的 Barcode Primer 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，使用时请详细阅读此附录。

-  **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。
 - Barcode Primer 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。

B-1 Barcode Primer 使用规则：

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

- 第一组：Barcode Primer-1 ~ 4 为 1 组碱基平衡 Barcode；
- 第二组：Barcode Primer-5 ~ 8 为 1 组碱基平衡 Barcode；
- 第三组：Barcode Primer-9 ~ 12 为 1 组碱基平衡 Barcode；
- 第四组：Barcode Primer-13 ~ 16 为 1 组碱基平衡 Barcode；
- 第五组：Barcode Primer-17 ~ 24 为 1 组碱基平衡 Barcode；
- 第六组：Barcode Primer-25 ~ 32 为 1 组碱基平衡 Barcode。

以上共 6 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 Barcode Primer 组合方案。

表 1 Barcode Primer 使用规则

样本数/ lane	方法 1	方法 2	方法 3	方法 4	方法 5	方法 6
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	样本 1: 17 ~ 20 样本 2: 21 ~ 24	样本 1: 25 ~ 28 样本 2: 29 ~ 32
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	样本 1: 17 ~ 18 样本 2: 19 ~ 20 样本 3: 21 ~ 24	样本 1: 25 ~ 26 样本 2: 27 ~ 28 样本 3: 29 ~ 32
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	样本1: 17 ~ 18 样本2: 19 ~ 20 样本3: 21 ~ 22 样本4: 23 ~ 24	样本 1: 25 ~ 26 样本 2: 27 ~ 28 样本 3: 29 ~ 30 样本 4: 31 ~ 32

样本数/ lane	方法 1	方法 2	方法 3	方法 4	方法 5	方法 6
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	样本 1: 17 样本 2: 18 样本 3: 19 样本 4: 20 样本 5: 21~24	样本 1: 25 样本 2: 26 样本 3: 27 样本 4: 28 样本 5: 29~32
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 1: 17 样本 2: 18 样本 3: 19 样本 4: 20 样本 5: 21~22 样本 6: 23~24	样本 1: 25 样本 2: 26 样本 3: 27 样本 4: 28 样本 5: 29~30 样本 6: 31~32
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	样本 1: 17 样本 2: 18 样本 3: 19 样本 4: 20 样本 5: 21 样本 6: 22 样本 7: 23~24	样本 1: 25 样本 2: 26 样本 3: 27 样本 4: 28 样本 5: 29 样本 6: 30 样本 7: 31~32
8	4组 Barcode Primer 任选2组		17~24		25~32	
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 Barcode Primer。 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 Barcode Primer, 并注意按照对应要求加不同组别的 Barcode Primer。					



- 提示**
- 需添加混合 Barcode Primer 的样本, N 个 Barcode Primer 之间要等体积混合后再加入样本中。
 - Barcode Primer (1~16) 是4个为一组碱基平衡 Barcode, 其中1~4为一组, 5~8为一组, 以此类推; Barcode Primer (17~32) 是8个为一组碱基平衡 Barcode, 其中17~24为一组, 25~32为一组。

附录 3 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

编号:H-020-000898-00

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
