ABcellar Pro Single Cell 3' RNA-seq Lib Prep Kit

RK20380



使用说明书

Version: N19K17v2.0

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 18

1. 产品概述

ABcellar Pro Single Cell 3' RNA-seq Lib Prep Kit (ABclonal，Cat. RK20380) 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 1000000 +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	16 RXN
ABcellar Single Cell 3' DropletGen Kit（RK20396）	🔴	RT Reagent	100 µL	400 µL
	🔴	Template Switch Oligo	10 µL	40 µL
	○	Reducing Agent	34 µL	136 µL
	🔴	RT Enzyme	20 µL	80 µL
	🔵	PCR Master Mix	200 µL	800 µL
	🔵	cDNA Primers	16 µL	64 µL
	○	Cleanup Buffer	728 µL	1.5 mL X 2
ABcellar Single Cell MaxPure Kit（RK20392）	○	Partitioning Oil	1.6 mL	6.4 mL
	🟢	Recovery Agent	400 µL	1.6 mL
	🟢	First strand cDNA Clean Beads	52 µL	208 µL
	🟢	Elution Buffer A	796 µL	1.6 mL X 2
	🔴	Elution Buffer B	576 µL	1.2 mL X 2
	○	AFTMag NGS DNA Clean Beads	1.2 mL	4.8 mL
ABcellar Single Cell 3' Barcode Beads Kit（RK20398）	○	Barcode Gel Beads *	700 µL X 4	700 µL X 16
ABcellar Single Cell Lib Prep Kit（RK20394）	🔵	FS Pro Enzymes II	40 µL	160 µL
	🔵	FS Pro Buffer I	20 µL	80 µL
	○	Ligase Enzymes	40 µL	160 µL
	○	FS Pro Ligation Buffer II	100 µL	400 µL
	🟣	2X PCR Master Mix	100 µL	400 µL
	○	Truncated Adapter	20 µL	80 µL
	🔵	i5XX Primer	5 µL	10 µL
	🟣	I7XX Primer	5 µL	10 µL
ABcellar Single Cell Chip Set（RK30150）		GEM Chip	1 pk	4 pk
		GEM Chip Gasket	1 pk	4 pk

注 1. ○ 代表管盖颜色；

注 2. Barcode Gel Beads 按需取管，避免再次冻融。若当次未使用，已解冻的 Barcode Gel Beads 可暂存至 4℃，并在一星期内用完，不可再次冻存。

3. 保存及运输条件

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

货号	名称	储存温度
RK20396	ABcellar Single Cell 3' DropletGen Kit	-20℃
RK20392	ABcellar Single Cell MaxPure Kit	4℃
RK20398	ABcellar Single Cell 3' Barcode Beads Kit*	-20℃
RK20394	ABcellar Single Cell Lib Prep Kit	-20℃
RK30150	ABcellar Single Cell Chip Set	R.T.

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/μL；

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。若想回收到更多细胞，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 40um 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' Barcode Beads Kit 保存至-80 ℃；Barcode Gel Beads 解冻后请转置 4℃保存，一周内用完，禁止再次放回-20℃，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 Barcode Gel Beads 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 Barcode Gel Beads 加载至ABcellar Single Cell Chip Set中时，将吸头垂直伸至加样孔底部，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 ℃ 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 (KH2PO4)	136.0	144.0	1.0588236
Sodium Chloride (NaCl)	58.0	9000.0	155.17241
Sodium Phosphate dibasic (Na2HPO4-7H2O)	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	2.6666667
Potassium Phosphate monobasic (KH2PO4)	136.0	200.0	1.4705882
Sodium Chloride (NaCl)	58.0	8000.0	137.93103
Sodium Phosphate dibasic (Na2HPO4-7H2O)	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 x 10^5 至 1.5 x 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 ℃ 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 ℃ 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 x 10^5 至 1.5 x 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 μL 台盼蓝染液与 10 μL 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/μL，冰上放置等待液滴生成实验。

注1：DPBS 不含 Ca2+，Mg2+，二价离子会和 RT 酶有一定的竞争反应；

注2：如果含有 Ca2+ 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' DropletGen Kit（RK20396）	●	RT Reagent	使用前需平衡至室温
	●	Template Switch Oligo	
	○	Reducing Agent	
	●	RT Enzyme	冰上溶解并混匀，瞬时离心收集溶液至管底，放置冰上备用
ABcellar Single Cell MaxPure Kit（RK20392）	○	Partitioning Oil	使用前需平衡至室温
ABcellar Single Cell 3' Barcode Beads Kit（RK20398）	○	Barcode Gel Beads	提前 1h 从-20℃拿出静置，平衡至室温，备用
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。

Barcode Gel Beads 预处理

7.2.1. 将 3′ scRNA-seq Kit C 中的 Barcode Gel Beads 从 -20 ℃ 取出，室温静置一小时；

7.2.2. 涡旋振荡 1min，使用离心机水平转子室温 1000 g 离心 5 min，吸取上清丢弃（尽量去除干净上清），注意观察微球和上清的界面，不要吸到微球；

RT Mix 制备

7.2.3. 制备 RT Mix：按照下表依次加入各组分，并使用移液器轻轻吹打 15-20 次充分混匀，瞬时离心后收集溶液至管底，冰上放置备用。

	试剂	体积
●	RT Reagent	25 μL
●	Template Switch Oligo	2.5 μL
○	Reducing Agent	2.5 μL
●	RT Enzyme	5 μL
	总体积	35 μL

ABcellar Single Cell Chip Set 加载

7.2.4. 取出 GEM Chip Gasket、GEM Chip 和新的透明平盖 PCR 八联管备用。

7.2.5. 将单细胞包裹仪器中的加样台取出，放置于水平台面上，依次将 PCR 八联管、GEM Chip 放置对应卡槽卡紧（如下图所示）。

注 1：将 GEM Chip 液滴出口对准 PCR 八联管，并推动右侧芯片压紧块进行固定；

注 2：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. 取出 Barcode Gel Beads 涡旋振荡 1min，瞬离 3 s，使用移液器吸取 70 μL Barcode Gel Beads，缓慢加入至 GEM Chip #1 通道，垂直加入通道底部，切勿吹出气泡；

7.2.7. 制备 Cell-RT Mix：吸取 40 μL DPBSB 重悬的细胞悬液加入上述 RT Mix 样品管中（步骤 7.2.3），轻轻吹打混匀，冰上放置备用。

7.2.8. 吸取上述 70 μL Cell-RT Mix（步骤 7.2.7 ）缓慢加入至 GEM Chip #2 通道，垂直加入底部，切勿吹出气泡；

7.2.9. 吸取 250 μL Partitioning Oil 缓慢加入至 GEM Chip #3 通道，贴壁加入；

7.2.10. 吸取 150 μL Partitioning Oil 缓慢加入至 GEM Chip #4 通道，贴壁加入；

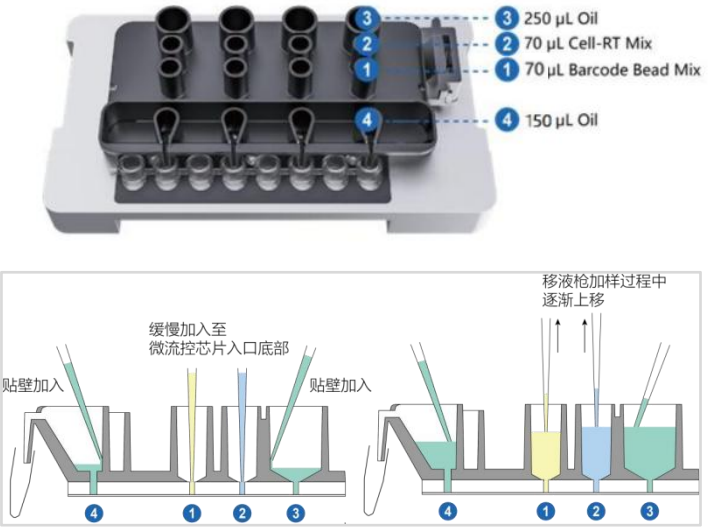


图1. 芯片加样示意图

7.2.11.取出GEM Chip Gasket 将 GEM Chip 盖紧，注意确认 GEM Chip Gasket 与 GEM Chip 完全贴合，立刻运行包裹。

注：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；



图 2. 加盖芯片示意图

注 1：未使用样品槽可用于下一次单细胞包裹实验。

注 2：使用前请确认废弃样品槽或未使用样品槽无污染或液体残留。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

7.2.12.打开 ABcellar 单细胞包裹仪开关，按下⏏，等待 OPEN 常亮，完成开门；

7.2.13.将已经加载好的芯片连同加样台一起放置于 ABcellar 单细胞包裹仪卡槽中卡紧；

注：加样台底部卡孔插入托盘对应卡柱；

7.2.14.按下⏏，在关门过程中，CLOSE 闪烁；待显示屏出现 

，完成关门。

7.2.15.按下▶/■，显示动画；待显示屏出现 

，液滴生成结束。

液滴转移

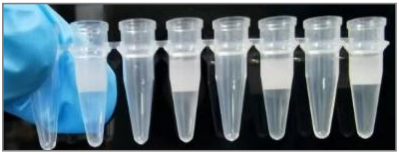
7.2.16.按下⏏，等待 OPEN 常亮，完成开门，取出加样台。

7.2.17.移除加样台上的芯片，小心取出装有液滴产物的 PCR 八联管。

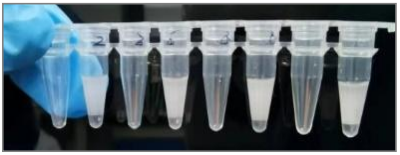
注：如芯片中有未使用的样品槽，标记好后妥善保存可用于下一次单细胞包裹实验。

7.2.18.使用 QSP 010-Q200 μL 吸头小心吸取下层清澈油相后丢弃；注意保留约 10 μL 下层清澈油相，以避免吸到上层乳白色液滴（如下图所示）。

注：若 PCR 管底部清澈油相保留过多，会使逆转录过程中，乳白色液滴液面超过 PCR 仪加热孔的深度，导致逆转录反应失败；



弃油前



弃油后

7.2.19.将上述样品管盖上 PCR 八联管管盖，短暂置于冰上备用，立即执行下一步操作。

液滴内逆转录反应

7.2.20.将上述样品管置于 PCR 仪中，立即运行如下反应程序（热盖 50℃）。

温度	时间	Cycles
42℃	90 min	-
50℃	2 min	10
42℃	2 min	
85℃	5 min	反应体积设置 100 μL
4℃	Hold	

7.2.21.反应结束后，立刻进行下一步操作；或者将产物放置于 4 ℃保存不超过 24 h 或 -20 ℃ 不超过 72 h。

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' DropletGen Kit（RK20396）	○	Reducing Agent	室温充分融解，涡旋混匀，瞬时离心收集溶液至管底，放置冰上备用
	🔵	PCR Master Mix	
	🔵	cDNA Primers	
	○	Cleanup Buffer	使用前需 65℃ 水浴加热约 10min 以充分融解，涡旋混匀 10s 直至管内无沉淀，瞬时离心后收集溶液至管底，室温放置备用
ABcellar Single Cell MaxPure Kit（RK20392）	🟢	Recovery Agent	使用前室温平衡 30 min，涡旋混匀，瞬时离心收集溶液至管底，室温放置备用
	🟢	Elution Buffer A	
	🔴	Elution Buffer B	
	🟢	First strand cDNA Clean Beads	室温平衡 30 min，使用前涡旋振荡使磁珠完全重悬
	○	AFTMag NGS DNA Clean Beads	
其他		80% 酒精	现配现用，室温放置
		Solution I	
		无核酸酶水 (NF Water)	室温或 4℃放置

破乳与纯化

7.3.1. 吸取 100 μL Recovery Agent 缓慢加入上述 PCR 管中（步骤 7.2.21 产物），静置 10s，此时乳白色液滴变澄清。

注：若上述样品管中，存在下层油相和上层水相的清晰分层，请继续下一步操作；若油相和水相界面依然有乳白色液滴，盖上管盖，将八联

管轻轻上下颠倒五次混匀，瞬时离心 10 s，直至乳白色液滴变澄清，下层油相和上层水相存在清晰分层。

7.3.2. 使用 QSP 010-Q200 μL 吸头缓慢吸取 110 μL 下层油相丢弃，保留上层水相，冰上放置备用。

7.3.3. 制备 Clean up Mix Ⅰ：按照下表依次加入各组分，使用移液器吹打 15-20 次充分混匀，瞬时离心后收集溶液至管底，室温放置备用。

	Clean up Mix Ⅰ	**体积**
○	Cleanup Buffer	182 μL
●	Reducing Agent	5 μL
●	First strand cDNA Clean Beads	13 μL
	总体积	200 μL

7.3.4. 吸取 200 μL Clean up Mix Ⅰ加入步骤 7.3.2 产物中，使用移液器轻轻吹打 15 次混匀，避免液体溢出。

7.3.5. 室温孵育 10 min；孵育开始后约 5 分钟，使用移液器再次轻轻吹打混匀，使磁珠重悬。

注：该步骤请使用低吸附枪头以减少样品损失。

7.3.6. 制备 Elution Solution Ⅰ：按照下表依次加入各组分，涡旋混匀后瞬时离心将溶液收集至管底，室温放置备用。

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

7.3.7. 10 分钟孵育结束后，将 PCR 管（步骤 7.3.5 产物）转移至磁力架（高位）上静置约 2 min，待溶液澄清后，移除上清液，注意不要碰到磁珠。

7.3.8. 使离心管保持在磁力架上，加入 300 μL 80% 乙醇，静置约 30s，待溶液澄清后，移除上清液。

7.3.9. 使离心管保持在磁力架上，加入 200 μL 80% 乙醇，静置约 30s，待溶液澄清后，移除上清液。

7.3.10.瞬时离心，将离心管转移至磁力架（低位）吸附 15 s，用 10 μL 吸头吸取多余酒精后，室温干燥 1min。

7.3.11.将离心管从磁力架上取出，加入 47 μL Elution Solution Ⅰ（步骤 7.3.6 产物），使用移液器轻轻吹打 15 次混匀后，室温孵育 2min。

注 1：该步骤请使用低吸附枪头以减少样品损失。

注 2：吹打混匀过程中，避免磁珠挂壁，避免产生气泡。

7.3.12.将离心管转移至磁力架（低位），静置约 2 min，待溶液澄清后，吸取 46 μL 上清液至新的 PCR 管中。



图 3. 磁力架位置示意图（适用于八联管）

cDNA 扩增

7.3.13.按照下表依次加入各组分：

	试剂	体积
●	PCR Master Mix	50 μL
●	cDNA Primers	4 μL
	cDNA（步骤 7.3.12 产物）	46 μL
	总体积	100 μL

7.3.14.将配置好的上述反应体系使用移液器吹打 15-20 次充分混匀，瞬时离心收集溶液至管底。置于 PCR 仪中，运行如下反应程序（热盖温度 105℃）：

温度	时间	Cycles
98℃	3 min	-
98℃	15 s	
60℃	20 s	12-16*
72℃	3 min	
72℃	5 min	-
4℃	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	13	-
PBMCs	13	细胞状态好
	14	细胞状态较差

7.3.15.扩增结束后，立刻进行下一步操作；或者将产物放置于 4 ℃ 暂存 24 h 或 -20 ℃ 不超过 72 h。

cDNA 扩增后纯化

7.3.16.将 AFTMag NGS DNA Clean Beads 震荡重悬，吸取 60 μL AFTMag NGS DNA Clean Beads 加入至上述 PCR 管（步骤 7.3.15 产物）中，上下吹打混匀 15 次。

7.3.17.室温孵育 5 min。

7.3.18.将 PCR 管转移至磁力架（高位）静置 2 min，待溶液澄清后，移除上清液，注意不要碰到磁珠。

7.3.19.使 PCR 保持在磁力架上，加入 200 μL 80% 乙醇漂洗磁珠，静置 30 s，待溶液澄清后，移除上清液。

7.3.20.重复步骤 7.3.19 一次。

7.3.21.瞬时离心，将 PCR 管转移至磁力架（低位）吸附 15 s，用 10 μL 吸头吸取多余酒精后，室温干燥 1min。

7.3.22.吸取 36 μL Elution Buffer B 加入上述 PCR 管中，使用移液器吹打 15-20 次充分混匀。

7.3.23.室温静置 5 min。

7.3.24.将 PCR 管转移至磁力架（高位），静置约 2 min，待溶液澄清后，吸取 35 μL 上清液至新的 PCR 管中。

7.3.25.反应结束后，立刻进行下一步操作；或者将产物放置于 4 ℃ 暂存 24 h 或 -20 ℃ 不超过 72 h。

cDNA 质量检测（以 Qubit4.0 & Qsep1 为例）

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

7.3.27.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。

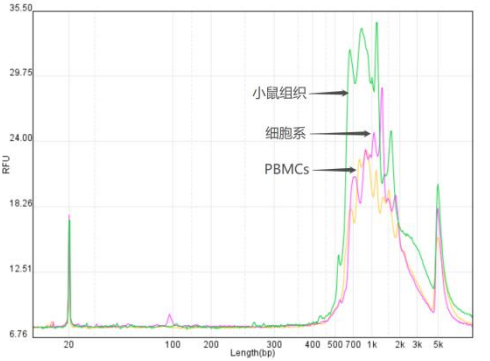


图2. cDNA Qsep100 片段分析图

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 MaxPure Kit（RK20392）	🔴	Elution Buffer B	使用前室温平衡 30 min，涡旋混匀，瞬时离心收集溶液至管底，室温放置备用
	○	AFTMag NGS DNA Clean Beads	室温平衡 30 min，使用前涡旋振荡使磁珠完全重悬
ABcellar Single Cell Lib Prep Kit（RK20394）	🔵	FS Pro Enzymes II	室温充分融解，涡旋混匀，瞬时离心收集溶液至管底，放置冰上备用
	🔵	FS Pro Buffer I	
	○	Ligase Enzymes	
	○	FS Pro FS Pro Ligation Buffer II	
	○	Truncated Adapter	
	🔵	i5xx Primer	
	🟣	i7xx Primer	
	🟣	2X PCR Master Mix	
其他		80% 酒精	
		无核酸酶水 (NF Water)	

片段化、末端修复及加 A 尾

7.4.1. 在 PCR 中提前设置并运行如下反应程序，将 PCR 仪提前降至 4℃预冷（热盖温度 82℃）：

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

7.4.2. 按照下表依次加入各组分：

	试剂	体积
●	FS Pro Buffer I	5 μL
●	FS Pro Enzymes II	10 μL
	cDNA（步骤 7.3.24 产物）	X μL（150 ng）**
	NF Water	Up to 50 μL
	总体积	50 μL

注：根据 cDNA 产物浓度，加入 150 ng（步骤 7.3.24）纯化后的 cDNA 产物（不足 150 ng 时，加入全部 35 μL 纯化后的 cDNA 产物）。

7.4.3. 将配置好的上述反应体系使用移液器吹打 15-20 次充分混匀，瞬时离心收集溶液至管底。

7.4.4. 将 PCR 管转移至上述已降至 4℃ 的 PCR 仪中，跳过第一步（4℃）Hold，起始后续反应程序。

7.4.5. 反应结束后，将 PCR 管取出，瞬时离心后冰上放置备用。

双端筛选

7.4.6. 吸取 50 μL NF Water 加入上述 PCR 管中（步骤 7.4.5）。

7.4.7. 将 AFTMag NGS DNA Clean Beads 震荡重悬，吸取 60 μL (0.6X) AFTMag NGS DNA Clean Beads (0.6X)加入至上述 PCR 管（步骤 7.4.6）中，用移液器上下吹打混匀 15 次后，室温孵育 5 min。

注：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。

7.4.8. 将 PCR 管转移至磁力架（高位），静置约 2 min，待溶液澄清后，吸取 155 μL 上清液至新的 PCR 管中。

7.4.9. 将 AFTMag NGS DNA Clean Beads 震荡重悬，吸取 20 μL (0.8X) AFTMag NGS DNA Clean Beads 加入上述新 PCR 管中，用移液器上下吹打混匀 15 次后，室温孵育 5 min。

7.4.10. 将上述 PCR 管转移至磁力架（高位）静置 2 min，待溶液澄清后，移除上清液。

7.4.11. 使 PCR 管保持在磁力架上，加入 200 μL 新鲜配制的 80% 酒精漂洗， 静置 30 s，移除上清液。

7.4.12. 重复步骤 7.4.11 一次。

7.4.13. 瞬时离心，将 PCR 管转移至磁力架（低位）吸附 15 s，用 10 μL 吸头吸取多余酒精后，室温干燥 1min。

7.4.14. 将 PCR 管从磁力架上取下，向管中加入 51 μL Elution Buffer B，浸泡 1 min，用移液器上下吹打混匀 15 次后，室温静置 5 min。

7.4.15. 将 PCR 管转移至磁力架（高位），静置约 2 min，待溶液澄清后，吸取 50 μL 上清液至新的 PCR 管中。

接头连接

7.4.16. 在 PCR 中提前设置并运行如下反应程序，将 PCR 仪提前降至 4℃预冷（热盖关闭）：

步骤	温度	时间
Hold	4 ℃	∞
接头连接	20 ℃	15 min
Hold	4 ℃	∞

7.4.17.按照下表依次加入各组分：

	试剂	体积
	步骤 7.4.15 产物	50 μL
○	FS Pro Ligation Buffer II	25 μL
○	Ligase Enzymes	10 μL
○	Truncated Adapter	5 μL
	NF Water	10 μL
	总体积	100 μL

7.4.18.将配置好的上述反应体系使用移液器吹打 15-20 次充分混匀，瞬时离心收集溶液至管底。

7.4.19.将 PCR 管转移至上述提前预冷的 PCR 仪中，跳过第一步（4℃）Hold，起始后续反应程序。

7.4.20.反应结束后，将 PCR 管取出，瞬时离心后冰上放置备用。

接头连接后纯化

7.4.21.待 AFTMag NGS DNA Clean Beads 震荡重悬，吸取 80 μL (0.8X) AFTMag NGS DNA Clean Beads 加入至上述 PCR 管中，用移液器上下吹打混匀 15 次，室温孵育 5 min。

7.4.22.将 PCR 管转移至磁力架（高位）吸附 2 min，待溶液澄清后，移除上清液。

7.4.23.使 PCR 管保持在磁力架上，加入 200 μL 新鲜配制的 80% 酒精漂洗， 静置 30 s，移除上清液。

7.4.24.重复步骤 7.4.23 一次。

7.4.25.瞬时离心，将 PCR 管转移至磁力架（低位）吸附 15 s，用 10 μL 吸头吸取多余酒精后，室温干燥 1min。

7.4.26.将 PCR 管从磁力架上取下，向管中加入 21 μL Elution Buffer B，用移液器上下吹打混匀 15 次后，室温静置 5 min。

7.4.27.将 PCR 管转移至磁力架（低位），静置约 2 min，待溶液澄清后，吸取 20 μL 上清液至新的 PCR 管中。

文库扩增

7.4.28.在 PCR 中提前设置并运行如下反应程序，将 PCR 仪提前降至 4℃预冷（热盖温度 105℃）：

温度	时间	Cycles
4℃	∞	
98℃	1 min	-
98℃	10 s	
54℃	30 s	13-14*
72℃	30 s	
72℃	5min	-
4℃	Hold	-

注：一般设 13 个 cycles，若 cDNA 投入量不足 150ng，此处可适当增加 1~2 cycles。

7.4.29.按照下表依次加入各组分：

	试剂	体积
	步骤 7.4.27 产物	20 μL
●	2X PCR Master Mix	25 μL
●	i5xx Primer	2.5 μL
●	i7xx Primer	2.5 μL
	总体积	50 μL

7.4.30.将配置好的上述反应体系使用移液器吹打 15-20 次充分混匀，瞬时离心收集溶液至管底。

7.4.31.将 PCR 管转移至上述提前预冷的 PCR 仪中，跳过第一步（4℃）Hold，起始后续反应程序。

7.4.32.反应结束后，将 PCR 管取出，瞬时离心后冰上放置备用。

文库片段选择

7.4.33.吸取 50 μL NF Water 加入上述 PCR 管中（步骤 7.4.32）。

7.4.34.将 AFTMag NGS DNA Clean Beads 震荡重悬，吸取 60 μL (0.6X) AFTMag NGS DNA Clean Beads 加入至上述 PCR 管（步骤 7.4.33）中，用移液器上下吹打混匀 15 次后，室温孵育 5 min。

注：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 PCR 管转移至磁力架（高位），静置约 2 min，待溶液澄清后，吸取 155 μL 上清液至新的 PCR 管中。

7.4.36.吸取 15 μL (0.75X) AFTMag NGS DNA Clean Beads 加入上述新 PCR 管中，用移液器上下吹打混匀 15 次后，室温孵育 5 min。

7.4.37.将上述 PCR 管转移至磁力架（高位）静置 2 min，待溶液澄清后，移除上清液。

7.4.38.使 PCR 管保持在磁力架上，加入 200 μL 新鲜配制的 80% 酒精漂洗， 静置 30 s，移除上清液。

7.4.39.重复步骤 7.4.38 一次。

7.4.40.瞬时离心，将 PCR 管转移至磁力架（低位）吸附 15 s，用 10 μL 吸头吸取多余酒精后，室温干燥 1min。

7.4.41.将 PCR 管从磁力架上取下，向管中加入 36 μL Elution Buffer B，浸泡 1 min，用移液器上下吹打混匀 15 次后，室温静置 5 min。

7.4.42.将 PCR 管转移至磁力架（低位），静置约 2 min，待溶液澄清后，吸取 35 μL 上清液至新的 PCR 管中。

7.4.43.产物放置于 4 ℃ 储存不超过 72 h 或 -20 ℃ 长期储存。

文库质量检测

7.4.44.cDNA 文库定量：吸取 1 μL 样本，用 Qubit4.0 进行定量

7.4.45.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/μL，片段主峰在 450bp 左右，呈正态分布。

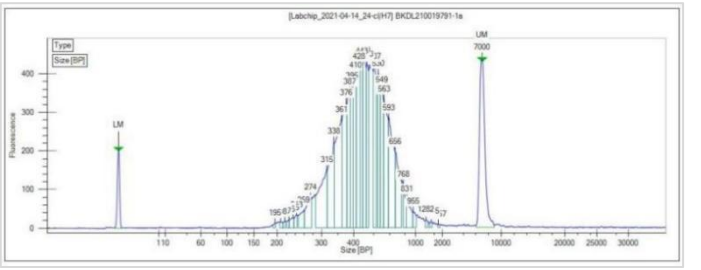


图 4. cDNA 文库 Agilent 2100 片段分析图

7.5. 文库测序

本操作手册描述了确保单细胞 3’ 端文库成功测序所必须提供的完整文库序列所需的步骤，根据本操作手册所获得的文库可在 Illumina Hiseq X10 或 Novaseq 6000 平台上机测序。样本 index 可用于区分不同样本并对碱基含量进行平衡。ABcellar Pro Single Cell 3' RNA-seq Lib Prep Kit 构建的 Illumina 的测序文库（图 5），文库结构由 P5/P7 桥式接头、Truseq Read1 和 Read2 标准的 Illumina 测序引物位点组成，同时加入了 8 bp 的双端索引序列作为 i5 和 i7 索引。Truseq Read1 (TCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT)用于对 16bp 的 Cell Barcode 和 12bp 的 UMI 进行测序。Truseq Read2 (GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT) 用于插入的基因序列进行测序。

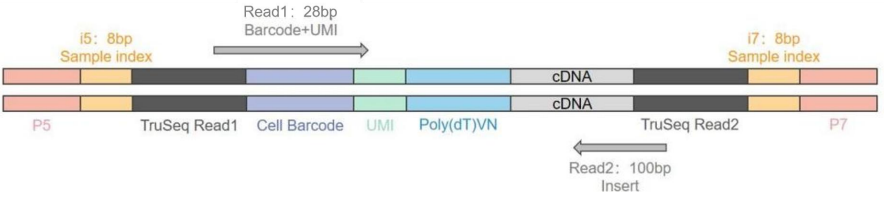


图 5. 文库结构示意图

建议测序深度为每个细胞 20000 Reads 以上，文库测序策略为 PE150 或 PE100 并拆分得到的全部数据。考虑到每个基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。

本操作手册提供了 8bp 的双端索引序列作为 i5 和 i7 索引，若要与 10bp 的双端 index 文库 Pooling 上机，只需将下表内的 i7 index 后添加“AT”两个碱基，同时 i5 index 后添加“GT”两个碱基。

本试剂盒包含 4 或 16 种 Index 组合。为满足更高通量需求，可选配 RK20399 ABcellar Dual Index Kit (96 Indices)，该试剂盒提供 96 种 Index 组合以供灵活选择。

P5 端 index		i5 Bases for Sample Sheet NextSeq and HiSeq 3000/4000 and Novaseq V1.5	P7 端 index		i7 Bases for Sample Sheet
●	i501 Primer	AGGTGCGT	●	i701 Primer	ATCCACTG
●	i502 Primer	GAACATAC	●	i702 Primer	GCTTGTCA
●	i503 Primer	CTTAAGCC	●	i703 Primer	TAAGTGGT
●	i504 Primer	GGAGTACT	●	i704 Primer	AACGTTCC
●	i505 Primer	GTGCGATA	●	i705 Primer	TGGATCGA
●	i506 Primer	GTTAATTG	●	i706 Primer	ATGAGGCC
●	i507 Primer	TTGGTGAG	●	i707 Primer	GACCTGAA
●	i508 Primer	CGCGGTTC	●	i708 Primer	TCTCTACT
			●	i709 Primer	TTACAGGA
			●	i710 Primer	GCACGGAC
			●	i711 Primer	CTCTCGTC
			●	i712 Primer	CCAAGTCT

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 Barcode Gel Beads 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 Barcode Gel Beads 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） Barcode Gel Beads 具有较高粘性；2）移液器缓慢地吸取和加入 Barcode Gel Beads，使实验中 Barcode Bead 体积足量且避免产生气泡；

8.4.5. Barcode Gel Beads 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 Barcode Gel Beads 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