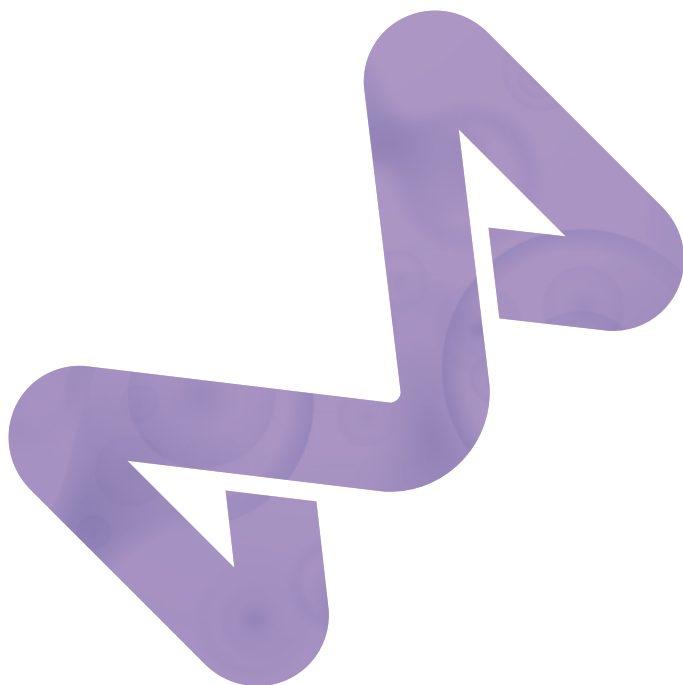


SOP-05-1003 v1.0 Rev C

MobiCube®

高通量单细胞 ChIP-seq 试剂

用户手册



CONTENTS

目录

前言

I	文档信息	04
II	版权说明	04
III	商标	04
IV	免责声明	04
V	产品名称	04
VI	安全指引	05

1. 简介

1.1	1.1 MobiCube® 高通量单细胞 ChIP-seq 细胞处理套装	06
1.2	MobiCube® 高通量单细胞 ChIP-seq 抗原表位试剂套装	07
1.3	MobiCube® 高通量单细胞芯片 C 套装	09
1.4	MobiCube® 高通量单细胞 ChIP-seq 建库系统套装	10
1.5	MobiCube® 高通量单细胞 ChIP-seq Dual Index 套装	11
1.6	推荐使用耗材/试剂/设备推荐列表	12
1.7	实验流程时间表	14
1.8	试剂预准备	14

2. 细胞预处理

2.1 试剂准备	15
2.2 样本寄送	16
2.3 细胞预处理	16

3. 抗体孵育和染色质打断

3.1 试剂准备	18
3.2 抗体孵育	22
3.3 染色质打断	25
3.4 回收细胞	25

4. 液滴生成和单细胞标记

4.1 试剂准备	26
4.2 预扩增试剂配制	27
4.3 细胞相试剂配制	27
4.4 芯片准备和加样	28
4.5 MobiNova® - 100 运行	31
4.6 液滴转移	34
4.7 液滴预处理	36
4.8 液滴预扩增	37



5. 预扩增后样品处理

5.1 试剂准备	38
5.2 破乳	38
5.3 过滤及清洗	39
5.4 预扩增产物纯化	40

6. 文库构建

6.1 试剂准备	41
6.2 文库标签扩增	41
6.3 文库片段分选	43
6.4 文库质检	44

附录

Troubleshooting	45
MobiCube® ChIP-seq Dual Index 套装 Index 列表	47
测序文库原理示意图	48
测序文库结构示意图	48

I 前言

I 文档信息

文档版本号: SOP-05-1003 v1.0 Rev C

文档名称: **MobiCube® 高通量单细胞 ChIP-seq 试剂用户手册**

II 版权说明

版权归墨卓生物科技(浙江)有限公司

墨卓生物MobiCube® 高通量单细胞 ChIP-seq 试剂及相关文件为墨卓生物科技(浙江)有限公司所有的机密信息。只有通过墨卓生物科技(浙江)有限公司(以下简称「墨卓生物」)认证的专业用户才具有使用本文包含的信息的权利。只有被墨卓生物特许的具有复制和 / 或转移权利的专业用户具有复制和 / 或转移该信息的权利。未经墨卓生物许可, 不得任意地仿制、拷贝、摘抄、转移或为其他使用。

III 商标



墨卓生物

IV 免责声明

本用户手册是以「现况」及「以当前明示的条件下」的状态提供给用户。在法律允许的范围内, 墨卓生物就本用户手册, 不提供任何明示或默示的担保及保证。如果用户不严格遵守相关操作手册中所包含的使用说明和安全防范措施使用, 包括不依照附加补充说明, 所有产品标签以及本产品的保修证书和销售的条款使用, 还有对本文包含的产品进行未经墨卓生物授权的任何变更, 墨卓生物将不承担由本产品造成的任何形式的涉及人身伤害或者财产损失的责任。

未经墨卓生物认证的程序或者操作方案, 墨卓生物将不为其提供保证。若用户使用上述程序或操作方案将自行承担全部责任。

本产品仅供科研使用, 不得用于医疗诊断。

V 产品名称

MobiCube®




高通量单细胞 ChIP-seq 试剂



墨卓生物

VI 安全指引

■ 符号说明

符号类型	说明
	警告: 在错误操作的情况下, 可能会引起严重的伤亡或破坏。务必时刻遵守这些安全操作说明, 且对用户有受伤的威胁要特别小心谨慎。
	注意: 在错误操作的情况下, 可能会给仪器带来损害及破坏, 为避免此类危害, 记载了相关注意事项。
	提示: 记载着重要说明。
	停止点: 表明此处为安全暂停点。

■ 废弃物处理

- ① 对于废弃物必须采取预防措施, 包括**特殊消毒、保护、处理**的方式;
- ② 废弃物(含仪器)的处置应当符合《中华人民共和国固体废物污染环境防治法》、《医疗废物管理条例》的要求。

1. 简介

1.1 MobiCube® 高通量单细胞 ChIP-seq 细胞处理套装

▪ PN - S190100101

MobiCube® 高通量单细胞 ChIP-seq 细胞处理套装		细胞预处理- 8 rxn & 染色质打断- 4 rxn	
试剂盒名称	组 分	数 量	货 号
MobiCube® ChIP-seq 细胞预处理试剂盒 PN - S191100101 (储存温度 室温)	● ChIP 细胞固定液	1	SPS191201
	○ ChIP 细胞终止液	1	SPS191202
	● ChIP 细胞冻存添加剂	1	SPS191203
	● ChIP DNA酶抑制剂	1	SPS191204
	● ChIP 细胞透膜剂1	1	SPS191205
MobiCube® ChIP-seq 染色质打断试剂盒 PN - S191200101 (储存温度 -20 °C)	● ChIP 细胞透膜剂2	1	SPS191106
	○ ChIP 蛋白酶抑制剂	1	SPS191107
	● ChIP 多功能缓冲液	1	SPS191108
	● ChIP 转座酶	1	SPS191109
	● ChIP 5 × 转座酶缓冲液	1	SPS191110
	● ChIP 细胞稳定剂	1	SPS191111

▪ PN - S190100102

MobiCube® 高通量单细胞 ChIP-seq 细胞处理套装		细胞预处理- 32 rxn & 染色质打断- 16 rxn	
试剂盒名称	组 分	数 量	货 号
MobiCube® ChIP-seq 细胞预处理试剂盒 PN - S191100102 (储存温度 室温)	● ChIP 细胞固定液	1	SPS191401
	○ ChIP 细胞终止液	1	SPS191402
	● ChIP 细胞冻存添加剂	1	SPS191403
	● ChIP DNA酶抑制剂	1	SPS191404
	● ChIP 细胞透膜剂1	1	SPS191405



MobiCube® 高通量单细胞 ChIP-seq 细胞处理套装		细胞预处理- 32 rxn & 染色质打断- 16 rxn	
试剂盒名称	组 分	数 量	货 号
MobiCube® ChIP-seq 染色质打断试剂盒 PN - S191200102 (储存温度 -20 °C)	 ChIP 细胞透膜剂2	1	SPS191306
	 ChIP 蛋白酶抑制剂	1	SPS191307
	 ChIP 多功能缓冲液	1	SPS191308
	 ChIP 转座酶	1	SPS191309
	 ChIP 5 × 转座酶缓冲液	1	SPS191310
	 ChIP 细胞稳定剂	1	SPS191311

1.2 MobiCube® 高通量单细胞 ChIP-seq 抗原表位试剂套装

MobiCube® 高通量单细胞 ChIP-seq抗体套装 - 4 rxn			
试剂盒名称	组 分	数 量	货 号
MobiCube® 高通量单细胞 ChIP-seq 抗原表位试剂 (H3K27ac) PN - S190500101 储存温度 -20 °C	 Anti-H3K27ac	1	SPS191112
	 Anti-H3K27ac 添加剂	1	SPS191113
	 Secondary Antibody	1	SPS191114
MobiCube® 高通量单细胞 ChIP-seq 抗原表位试剂 (H3K27me3) PN - S190600101 储存温度 -20 °C	 Anti-H3K27me3	1	SPS191115
	 Secondary Antibody	1	SPS191114
MobiCube® 高通量单细胞 ChIP-seq 抗原表位试剂 (H3K4me3) PN - S190700101 储存温度 -20 °C	 Anti-H3K4me3	1	SPS191116
	 Secondary Antibody	1	SPS191114
MobiCube® 高通量单细胞 ChIP-seq 抗原表位试剂 (H3K4me1) PN - S190800101 储存温度 -20 °C	 Anti-H3K4me1	1	SPS191117
	 Secondary Antibody	1	SPS191114
MobiCube® 高通量单细胞 ChIP-seq 抗原表位试剂 (H3K36me3) PN - S190900101 储存温度 -20 °C	 Anti-H3K36me3	1	SPS191118
	 Secondary Antibody	1	SPS191114

MobiCube® 高通量单细胞 ChIP-seq抗体套装 - 4 rxn

试剂盒名称	组 分	数 量	货 号
MobiCube® 高通量单细胞 ChIP-seq 抗原表位试剂 (Phospho-Rpb1 CTD (Ser5)) PN - S191000101 储存温度 -20 °C	● Anti-Phospho-Rpb1 CTD (Ser5)	1	SPS191119
	● Secondary Antibody	1	SPS191114

MobiCube® 高通量单细胞 ChIP-seq抗体套装 - 16 rxn

试剂盒名称	组 分	数 量	货 号
MobiCube® 高通量单细胞 ChIP-seq 抗原表位试剂 (H3K27ac) PN - S190500102 储存温度 -20 °C	● Anti-H3K27ac	1	SPS191312
	● Anti-H3K27ac 添加剂	1	SPS191313
	● Secondary Antibody	1	SPS191314
MobiCube® 高通量单细胞 ChIP-seq 抗原表位试剂 (H3K27me3) PN - S190600102 储存温度 -20 °C	● Anti-H3K27me3	1	SPS191315
	● Secondary Antibody	1	SPS191314
MobiCube® 高通量单细胞 ChIP-seq 抗原表位试剂 (H3K4me3) PN - S190700102 储存温度 -20 °C	● Anti-H3K4me3	1	SPS191316
	● Secondary Antibody	1	SPS191314
MobiCube® 高通量单细胞 ChIP-seq 抗原表位试剂 (H3K4me1) PN - S190800102 储存温度 -20 °C	● Anti-H3K4me1	1	SPS191317
	● Secondary Antibody	1	SPS191314
MobiCube® 高通量单细胞 ChIP-seq 抗原表位试剂 (H3K36me3) PN - S190900102 储存温度 -20 °C	● Anti-H3K36me3	1	SPS191318
	● Secondary Antibody	1	SPS191314
MobiCube® 高通量单细胞 ChIP-seq 抗原表位试剂 (Phospho-Rpb1 CTD (Ser5)) PN - S191000102 储存温度 -20 °C	● Anti-Phospho-Rpb1 CTD (Ser5)	1	SPS191319
	● Secondary Antibody	1	SPS191314



1.3 MobiCube® 高通量单细胞芯片 C 套装

■ PN - S190200101 储存温度 常温

MobiCube® ChIP-seq 芯片 C 试剂盒 - 8 rxn		
组 分	数 量	货 号
芯片C	2	SPS191321
垫片C	2	SPS191322
● ChIP 液滴保护剂	1	SPS191206
● ChIP 液滴生成油	1	SPS191207
● ChIP 回收剂	1	SPS191208
● ChIP 液滴稳定剂T1	1	SPS191209
● ChIP 液滴稳定剂T2	1	SPS191210
○ ChIP 细胞 (核) 悬浮液添加剂	1	SPS191211

■ PN - S190200102 储存温度 常温

MobiCube® ChIP-seq 芯片 C 试剂盒 - 32 rxn		
组 分	数 量	货 号
芯片C	8	SPS191321
垫片C	8	SPS191322
● ChIP 液滴保护剂	4	SPS191206
● ChIP 液滴生成油	4	SPS191207
● ChIP 回收剂	4	SPS191208
● ChIP 液滴稳定剂T1	1	SPS191409
● ChIP 液滴稳定剂T2	1	SPS191410
○ ChIP 细胞 (核) 悬浮液添加剂	1	SPS191411

1.4 MobiCube® 高通量单细胞 ChIP-seq 建库系统套装

■ PN - S190300101

MobiCube® 高通量单细胞 ChIP-seq 建库系统套装 - 4 rxn

试剂盒名称	组 分	数 量	货 号
MobiCube® ChIP-seq 预扩增试剂盒 PN - S191300101 (储存温度 -20 °C & 滤芯 常温)	 ChIP 5 × 预扩增缓冲液	1	SPS191130
	 ChIP 预扩增增强剂	1	SPS191131
	 ChIP 预扩增酶	1	SPS191132
	 ChIP 细胞核悬浮液	1	SPS191133
	ChIP 滤芯	5	SPS191123
MobiCube® ChIP-seq 微球试剂盒 PN - S191400101 (储存温度 -80 °C)	ChIP 微球	4	SPS191134
MobiCube® ChIP-seq 文库扩增试剂盒 PN - S191500101 (储存温度 -20 °C)	 ChIP 5 × 重悬缓冲液	1	SPS191135
	 ChIP 1 × TE 缓冲液	1	SPS191136
	 ChIP 2 × 扩增混合液	1	SPS191137

■ PN - S190300102

MobiCube® 高通量单细胞 ChIP-seq 建库系统套装 - 16 rxn

试剂盒名称	组 分	数 量	货 号
MobiCube® ChIP-seq 预扩增试剂盒 PN - S191300102 (储存温度 -20 °C & 滤芯 常温)	 ChIP 5 × 预扩增缓冲液	1	SPS191330
	 ChIP 预扩增增强剂	1	SPS191331
	 ChIP 预扩增酶	1	SPS191332
	 ChIP 细胞核悬浮液	4	SPS191333
	ChIP 滤芯	20	SPS191323
MobiCube® ChIP-seq 微球试剂盒 PN - S191400102 (储存温度 -80 °C)	ChIP 微球	16	SPS191334
MobiCube® ChIP-seq 文库扩增试剂盒 PN - S191500102 (储存温度 -20 °C)	 ChIP 5 × 重悬缓冲液	1	SPS191335
	 ChIP 1 × TE 缓冲液	1	SPS191336
	 ChIP 2 × 扩增混合液	1	SPS191337

1.5 MobiCube® 高通量单细胞 ChIP-seq Dual Index 套装

▪ PN - S190400101 储存温度 -20 °C

MobiCube® 高通量单细胞ChIP-seq Dual Index套装 - 48 rxn

组 分	数 量	货 号
ChIP 扩增引物 C-1	1	SPS191138
ChIP 扩增引物 C-2	1	SPS191139
ChIP 扩增引物 C-3	1	SPS191140
ChIP 扩增引物 C-4	1	SPS191141
ChIP 扩增引物 C-5	1	SPS191142
ChIP 扩增引物 C-6	1	SPS191143
ChIP 扩增引物 C-7	1	SPS191144
ChIP 扩增引物 C-8	1	SPS191145
ChIP 扩增引物 C-9	1	SPS191146
ChIP 扩增引物 C-10	1	SPS191147
ChIP 扩增引物 C-11	1	SPS191148
ChIP 扩增引物 C-12	1	SPS191149
ChIP 扩增引物 C-13	1	SPS191150
ChIP 扩增引物 C-14	1	SPS191151
ChIP 扩增引物 C-15	1	SPS191152
ChIP 扩增引物 C-16	1	SPS191153

1.6 推荐使用耗材/试剂/设备推荐列表

序号	耗材	品牌	货号
1	1.5 mL 低吸附离心管	SARSTEDT	72.706.700
2	0.2 mL PCR 管	AXGEN	PCR-02-L-C
3	0.2 mL 八连排 PCR 管	SARSTEDT	72.991.002
4	细胞计数板	CountStar	CO010101
5	40 μm 滤网	Corning	431750
6	移液器枪头	Pipette Tips RT LTS 200 μL FL 960A / 10	30389240
		Pipette Tips RT LTS 200 μL FLW 960A / 10	30389241
		Pipette Tips RT LTS 1000 μL FL 768A / 8	30389213
		Pipette Tips RT LTS 20 μL FL 960A / 10	30389226

序号	试剂	品牌	货号
1	MLtraPure™ Distilled Water (无核酸酶水, NF-H ₂ O)	赛默飞	10977015
2	PBS缓冲液 (pH 7.4)	赛默飞	10010049
3	无水乙醇	默克	E7023-500ML
		生工	A500737-0500
4	99% 甘油	生工	A100854
5	SPRIselect beads	贝克曼	B23317
6	1 M Tris-HCl (pH 8.0)	赛默飞	15568-025
7	0.5 M EDTA (pH 8.0)	赛默飞	15575-038
8	安捷伦高灵敏度 DNA 试剂盒	安捷伦	5067-4626
9	Qubit™ 1 × dsDNA HS 检测试剂盒	英潍捷基	Q33230
10	AO / PI	CountStar	RE010212
11	1640 培养基	赛默飞	11875-093/101

序号	设备	品牌	货号
1	PCR 仪	东胜龙	ETC811PLUS
		赛默飞	MiniAmp Plus
2	miniSpin plus 台式高速离心机	艾本德	5453000097
3	DynaMag™ - 2 磁力架	赛默飞	12321D
4	NEBNext MAGNETIC SEPARATION Rack	NEB	S1515S
5	2100 生物分析仪	安捷伦	G2939BA
6	Qubit™ 4 荧光计	英潍捷基	Q33238
7	Countstar 全自动细胞荧光分析仪	Countstar	IN050101
8	试管旋转混匀器	美国精骐	TR-02U
9	冷冻离心机	艾本德	5942000695
10	瞬时离心机	力辰	LC-Mini-10K
11	Vortex 涡旋混匀仪	杭州三永德	Vortex-2
12	移液器	Pipet-Lite M μ Lti Pipette L8-50XLS+	17013804
		Pipet-Lite M μ Lti Pipette L8-200XLS+	17013805
		Pipet-Lite M μ Lti Pipette L8-10XLS+	17013802
		Pipet-Lite M μ Lti Pipette L8-20XLS+	17013803
		Pipet-Lite LTS Pipette L-2 \times LS+	17014393
		Pipet-Lite LTS Pipette L-10XLS+	17014388
		Pipet-Lite LTS Pipette L-20XLS+	17014392
		Pipet-Lite LTS Pipette L-100XLS+	17014384
		Pipet-Lite LTS Pipette L-200XLS+	17014391
		Pipet-Lite LTS Pipette L-1000XLS+	17014382

1.7 实验流程时间表

时间节点	步 骤	操作步骤	消耗时间	实验操作时间	
30分钟	步骤 1: 细胞预处理	细胞预处理	30 分钟	20 分钟	
5 小时 30分钟	步骤 2: 抗体孵育和染色质打断	抗体孵育	4.5 小时	25 分钟	
		染色质打断	45 分钟	5 分钟	
		细胞回收	15 分钟	15 分钟	
1 小时 15 分钟	步骤 3: 液滴生成和单细胞标记	MobiNova® - 100 运行	6 分钟	6 分钟	
		液滴预处理	5 分钟	5 分钟	
		液滴预扩增	64 分钟	14 分钟	 停止点: -80 °C ≤ 1 周
50 分钟	步骤 4: 预扩增后样品处理	破乳, 过滤及清洗	10 分钟	10 分钟	
		预扩增产物纯化	40 分钟	40 分钟	 停止点: -20 °C ≤ 4 周
2 小时 30 分钟	步骤 5: 文库构建	文库标签扩增	1 小时	5 分钟	 停止点: -20 °C ≤ 4 周
		文库片段分选	40 分钟	40 分钟	 停止点: -20 °C ≤ 4 周
		文库质检	50 分钟	10 分钟	

1.8 试剂预准备

50% 甘油

按照下述步骤稀释 99% 甘油:

- 将 99% 甘油与去离子水或超纯水等体积混合;
- 通过 0.2 μm 过滤器过滤;
- 使用 15 mL 低吸附离心管分装, 室温储存。

2. 细胞预处理

2.1 试剂准备

细胞预处理准备	存储温度	注意事项
PBS	4 °C	自备, 冰上放置
FBS	-20 °C	自备, 化冻后, 冰上放置
● ChIP 细胞固定液	室温	
○ ChIP 细胞终止液	室温	
● ChIP 细胞冻存添加剂	室温	
● ChIP DNA酶抑制剂	室温	
● ChIP 细胞稳定剂	- 20 °C	化冻后, 冰上放置

按照下表配制细胞稳定缓冲液:

细胞稳定缓冲液	1 × (μL)	终浓度
PBS	2178	-
● ChIP 细胞稳定剂	22	1 ×
总计	2200	



提示:

配制完毕的细胞稳定缓冲液可在 4 °C 保存一周。

按下表配制细胞冻存液:

细胞冻存液	1 × (μL)	终浓度
FBS	890	-
● ChIP 细胞冻存添加剂	100	1 ×
● ChIP DNA酶抑制剂	10	1 ×
总计	1000	



提示:

若将处理后的细胞直接进行 ChIP-seq 实验, 则不需要配制细胞冻存液。

2.2 样本寄送

2.2.1 细胞系寄送

- ① 选取状态良好且铺满 2 / 3 培养瓶的细胞;
- ② 将培养瓶灌满培养基 (在瓶颈处留一点缝, 防止细胞缺氧);
- ③ 用封口膜封好瓶口, 防止细胞污染;
- ④ 找一个大小合适的泡沫盒子, 盒子底部铺满防震的缓冲物质;
- ⑤ 把细胞放进盒子中卡住 (当环境温度较低, 可放一个暖宝宝, 但与细胞隔开);
- ⑥ 在盒子上部再铺满防震的缓冲物质;
- ⑦ 自行或快递寄送, 最后在盒子上写上提示语“勿剧烈晃动”。



提示:

若是贴壁细胞, 则需寄送一些消化用的酶液及培养基。

2.2.2 组织寄送

组织存放于组织保存液, 4 °C 运送。

2.3 细胞预处理

- ① 新鲜单细胞悬液【推荐用 1.5 mL 离心管】经 4 °C 300 g 离心, 5 分钟;
- ② 去掉上清, 用 1 mL 的 PBS 进行重悬, 4 °C 300 g 离心, 5 分钟;
- ③ 去掉上清, 用 1 mL 的 PBS 对细胞沉淀进行重悬, 取 10 μ L 细胞计数、质控;



提示:

提前打开 37 °C 水浴锅;

进行下一步实验对于细胞的要求:

细胞数大于 30 万正常进行后续实验, 20-30 万有风险; 20 万以下不建议进行后续实验;

细胞活性大于 80%, 结团率小于 5% 可正常进行后续实验;

细胞活性在 70%-80%, 结团率在 5%-15% 之间可以风险进入后续实验;

细胞活性小于 70%, 结团率大于 15% 不建议进行后续实验。



- ④ 将装有细胞悬液的离心管, 在 37 °C 水浴锅中放置 15 秒, 取出后室温放置 2 分钟, 使细胞完全恢复室温;
- ⑤ 每 1 mL 细胞悬液加入 7 μ L (若 PBMC 则加 2.8 μ L) 的细胞固定液, 用移液器轻轻吹打 3-4 下混匀, 室温孵育 3 分钟 (确保时间把控);
- ⑥ 孵育结束后, 再向其中加入 17 μ L (若 PBMC 则加 6.8 μ L) 的细胞终止液, 用移液器轻轻吹打 3-4 混匀, 室温孵育 3 分钟 (确保时间把控);
- ⑦ 立即补加 5 μ L ChIP 细胞稳定剂, 混合均匀, 4 °C 300 g 离心, 5 分钟;
- ⑧ 去掉上清, 用 1 mL 细胞稳定缓冲液对细胞沉淀进行重悬, 4 °C 300 g 离心, 5 分钟。

**提示:**

预处理后的细胞, 推荐选择使用新鲜细胞直接实验, 若需要长途运输或者时间较晚可选择将细胞冻存后再进行实验。

■ 2.3.1 新鲜细胞直接实验 (推荐):

- a) 去掉上清, 用适量的细胞稳定缓冲液对细胞沉淀进行重悬 (细胞密度维持在 1500 个 / μ L—3000 个 / μ L 之间);
- b) 取 30 万 细胞进入后续实验。

■ 2.3.2 冻存细胞复苏后实验

- a) 提前配制细胞冻存液混合均匀放置在冰上备用;
- b) 去掉上清, 用 1 mL 细胞稳定缓冲液对细胞沉淀进行重悬, 4 °C 300 g 离心, 5 分钟;
- c) 去掉上清, 用细胞冻存液进行重悬【冻存液的添加依据细胞量, 分管冻存, 一般建议 100 万 细胞 / 400 μ L 冻存剂/管】, 然后转移至 1.5 mL 管;
- d) 将装有细胞的 1.5 mL 管放入常温梯度冻存盒并盖好盖子, 再将装有细胞的冻存盒转入 -80 °C 冰箱冻存 (至少需冻存 24 h) 【后续可进行低温 (-80 °C) 长距离运输, 亦可将细胞复苏后进入单细胞 ChIP-seq 实验】;
- e) 提前 37 °C 预热水浴锅, 按照试剂准备配制细胞稳定缓冲液 2.2 mL;
- f) 取 5 mL 的 PBS 放置在水浴锅中, 37 °C 提前预热;
- g) 取出冻存的细胞于 37 °C 水浴锅迅速化冻;
- h) 补加预热的 PBS 至 1.5 mL;
- i) 轻轻的颠倒混匀, 4 °C 300 g 离心, 5 分钟;
- j) 去除上清, 用 1 mL 细胞稳定缓冲液将细胞沉淀重悬, 4 °C 300 g 离心, 5 分钟;
- k) 去除上清, 用适量细胞稳定缓冲液将细胞沉淀重悬 (细胞密度维持在 1500 个 / μ L—3000 个 / μ L 之间);
- l) 取 30 万 细胞进入后续实验。

3. 抗体孵育和染色质打断

3.1 试剂准备

抗体孵育准备		存储温度	注意事项
PBS		4 °C	自备, 冰上放置
● ChIP 细胞稳定剂		- 20 °C	冰上放置
● ChIP 细胞透膜剂1		室温	
● ChIP DNA酶抑制剂		室温	
● ChIP 细胞透膜剂2		- 20 °C	冰上放置
○ ChIP 蛋白酶抑制剂		- 20 °C	冰上放置
● ChIP 多功能缓冲液		- 20 °C	冰上放置
选用	MobiCube 高通量单细胞 ChIP-seq 抗体套装 (H3K27ac)	- 20 °C	冰上放置
	MobiCube 高通量单细胞 ChIP-seq 抗体套装 (H3K27me3)	- 20 °C	冰上放置
	MobiCube 高通量单细胞 ChIP-seq 抗体套装 (H3K4me3)	- 20 °C	冰上放置
	MobiCube 高通量单细胞 ChIP-seq 抗体套装 (H3K4me1)	- 20 °C	冰上放置
	MobiCube 高通量单细胞 ChIP-seq 抗体套装 (H3K36me3)	- 20 °C	冰上放置
	MobiCube 高通量单细胞 ChIP-seq 抗体套装 (Phospho-Rpb1 CTD (Ser5))	- 20 °C	冰上放置

转座酶孵育准备	存储温度	注意事项
● ChIP 转座酶	- 20 °C	冰上放置
● ChIP 细胞透膜剂1	室温	
● ChIP DNA酶抑制剂	室温	
● ChIP 细胞透膜剂2	- 20 °C	冰上放置
○ ChIP 蛋白酶抑制剂	- 20 °C	冰上放置
● ChIP 多功能缓冲液	- 20 °C	冰上放置

染色质打断准备	存储温度	注意事项
● ChIP 5 × 转座酶缓冲液	- 20 °C	冰上放置
○ ChIP 蛋白酶抑制剂	- 20 °C	冰上放置
NF-H ₂ O	室温	
● ChIP细胞核悬浮液	- 20 °C	冰上放置

■ 按照下表配制细胞稳定缓冲液：

细胞稳定缓冲液	1 × (μL)	终浓度
PBS	990	-
● 细胞稳定剂	10	1 ×
总计	1000	



提示:

配制完毕的细胞稳定缓冲液可在 4 °C 保存一周。

■ 按照下表稀释 ChIP 多功能缓冲液:

1 × ChIP多功能缓冲液试剂	1 × (μL)	1 × (μL)	终浓度
NF-H ₂ O	900	890	-
● ChIP 多功能缓冲液试剂	100	100	1 ×
● Anti-H3K27ac 添加剂(选用)	-	10	1 ×
总计	1000	1000	



提示:

配制 1 mL 1 × ChIP 多功能缓冲液可满足一管样品孵育;
配制完毕的 1 × ChIP 多功能缓冲液可在 4 °C 保存一周。



注意:

使用MobiCube 高通量单细胞 ChIP-seq 抗体套装 (H3K27ac) , 1 × ChIP 多功能缓冲液试剂和染色质打断 buffer 需要额外添加 Anti-H3K27ac 添加剂。

■ 按照下表配制抗体孵育 buffer:

抗体孵育 buffer	1.1 × (μL)	4.4 × (μL)
1 × ChIP 多功能缓冲液试剂	220	880
● ChIP 细胞透膜剂 1	5.5	22
● ChIP DNA酶抑制剂	2.2	8.8
● ChIP 细胞透膜剂 2	0.9	3.6
○ ChIP 蛋白酶抑制剂	2.2	8.8



提示:

现配现用, 配制完毕于冰上放置。

■ 按照下表配制转座酶孵育 buffer:

转座酶孵育 buffer	1.1 × (μL)	4.4 × (μL)
1 × ChIP 多功能缓冲试剂	110	440
● ChIP 细胞透膜剂1	2.8	11.2
● ChIP 细胞透膜剂2	0.5	2
○ ChIP 蛋白酶抑制剂	1.1	4.4



提示:

ChIP 细胞透膜剂 1 为 40 ×, ChIP 细胞透膜剂 2 为 250 ×, 转座酶孵育 buffer 中终浓度均为 1 ×。转座酶孵育 buffer 现配现用, 配制完毕于冰上放置。

■ 按照下表配制转座酶 wash buffer:

转座酶 wash buffer	1.1 × (μL)	4.4 × (μL)
1 × ChIP 多功能缓冲试剂	440	1760
● ChIP 细胞透膜剂 1	11	44
● ChIP 细胞透膜剂 2	1.8	7.2



提示:

现配现用, 配制完毕于冰上放置。

■ 按照下表配制染色质打断 buffer:

染色质打断 buffer	1.1 × (μL)	2.2 × (μL)
● ChIP 5 × 转座酶缓冲液	20	40
○ ChIP 蛋白酶抑制剂	1	2
NF-H ₂ O	69	138
● Anti-H3K27ac 添加剂(选用)	1	2



提示:

建议按照 1.1 × 配制, 可用于 5 管样品反应, 现配现用。

3.2 抗体孵育

细 胞	离心条件
细胞系 / 原代细胞	200 g 3 分钟
PBMC / 组织细胞	300 g 3 分钟

■ 注: 后续实验离心力按照上表进行选择

抗 体	抗体孵育方式选择	一抗孵育时间
H3K27ac	孵育方式 1	2 小时
H3K4me1		2 小时
H3K4me3		3 小时
Rpb1		3 小时
H3K27me3	孵育方式 2	2 小时
H3K36me3		3 小时



注 意:

离心机应选用水平转头 (如图左), 以减少离心造成的细胞损失。。



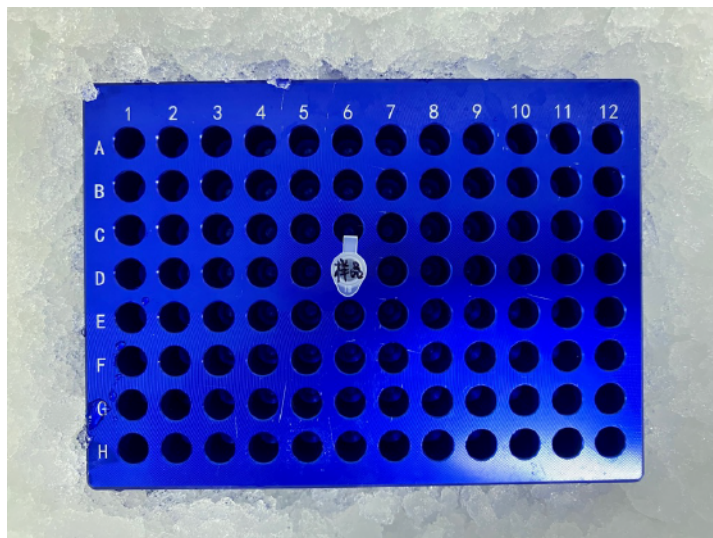


图 1: 细胞冰上放置

**注意:**

细胞孵育过程全程于冰或冰盒上操作, 冰盒需提前从 -20°C 冰箱中取出, 置于 4°C 冰箱恢复至 4°C 后使用, 样本置于冰或冰盒上操作。

孵育方式 1

- 准备一定数量待用的 $200\ \mu\text{L}$ PCR管, 用 $200\ \mu\text{L}$ 移液器吸取 $50\ \mu\text{L}$ 细胞稳定缓冲液加入管中, 上下颠倒数次, 使管盖及内壁被充分润洗, 瞬时离心, 用 $200\ \mu\text{L}$ 移液器吸取 $50\ \mu\text{L}$ 细胞稳定缓冲液, 丢弃, 将每个 PCR管做好相应标记, 备用;
- 将 $200\ \mu\text{L}$ 移液器枪头在细胞稳定缓冲液中吸打 3 次, 使枪头被充分润洗, 用此枪头取 30 万 细胞加入步骤 a 中相应 PCR管;
- 4°C 离心, 先使用 $200\ \mu\text{L}$ 移液器丢弃 90% 上清, 约留 $10\ \mu\text{L}$, 再用 $20\ \mu\text{L}$ 移液器小心吸取剩余上清残留;

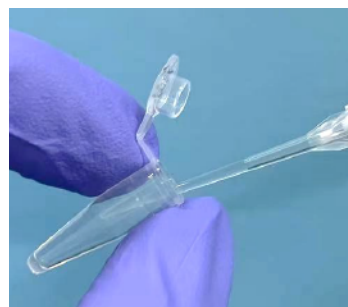
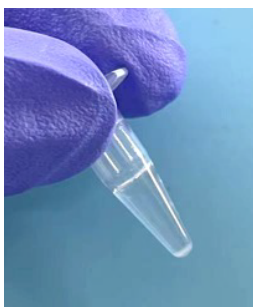


图 2: 丢弃上清

**提示:**

每次丢弃上清时, 枪头勿接触细胞, 小心吸取, 可以留约 $3\ \mu\text{L}$ 液体。

- d. 用 200 μL 移液器吸取 100 μL 抗体孵育 buffer 沿 PCR管壁缓慢加入(勿用移液器吹打), 再加入 1 μL 一抗 (移液器轻吹 3 下);
- e. 将 200 μL 移液器枪头在细胞稳定缓冲液中吸打 3 次, 使枪头被充分润洗, 移液器轻吹细胞 3 下, 使细胞分散均匀;
- f. 使用试管旋转混匀器旋转, 4°C 孵育 2 或 3 小时, 转速 10 r/分钟;
- g. 孵育完毕后 4°C 离心, 先使用 200 μL 移液器丢弃 90% 上清, 约留 10 μL , 再用 20 μL 移液器小心吸取剩余上清残留;
- h. 用200 μL 移液器吸取 100 μL 抗体孵育 buffer 沿 PCR管壁缓慢加入(勿用移液器吹打), 再加入 0.5 μL 的二抗(移液器轻吹 3下);
- i. 将 200 μL 移液器枪头在细胞稳定缓冲液中吸打 3 次, 使枪头被充分润洗, 移液器轻吹细胞 3 下, 使细胞分散均匀;
- j. 使用试管旋转混匀器, 4°C 孵育 20 分钟, 转速10 r/分钟;
- k. 孵育完毕后 4°C 离心, 先使用 200 μL 移液器丢弃 90% 上清, 约留 10 μL , 再用 20 μL 移液器小心吸取剩余上清残留;
- l. 用 200 μL 移液器吸取 200 μL 1 \times ChIP 多功能缓冲液, 沿 PCR管壁缓慢加入;
- m. 将 200 μL 移液器枪头在细胞稳定缓冲液中吸打 3 次, 使枪头被充分润洗, 移液器轻吹 3 下, 使细胞分散均匀;
- n. 使用试管旋转混匀器, 4°C 孵育 5 分钟, 转速 10 r / 分钟;
- o. 孵育完毕后 4°C 离心, 先使用 200 μL 移液器丢弃 90% 上清, 约留 10 μL , 再用 20 μL 移液器小心吸取剩余上清残留;
- p. 用 200 μL 移液器吸取 100 μL 转座酶孵育buffer, 沿 PCR管壁缓慢加入, 加入 1 μL ChIP 转座酶, 用移液器轻吹 8-10 下;
- q. 将 200 μL 移液器枪头在细胞稳定缓冲液中吸打 3 次, 使枪头被充分润洗, 移液器轻吹 3 下, 使细胞分散均匀;
- r. 使用试管旋转混匀器, 4°C 孵育 60 分钟, 转速 10 r/分钟。

孵育方式 2

- a. 用移液器吸取二抗与ChIP转座酶, 按照 1:2 混合 (每管细胞使用 1.5 μL) , 使用试管旋转混匀器, 室温孵育 2-3 小时, 转速 10 r/分钟;
- b. 准备一定数量待用的200 μL PCR管, 用 200 μL 移液器吸取 50 μL 细胞稳定缓冲液加入管中, 上下颠倒数次, 使管盖及内壁被充分润洗, 瞬时离心, 用 200 μL 移液器吸取 50 μL 细胞稳定缓冲液, 丢弃, 将每个 PCR管做好相应标记, 备用;
- c. 将 200 μL 移液器枪头在细胞稳定缓冲液中吸打 3 次, 使枪头被充分润洗, 用此枪头取 30 万细胞加入步骤 b 中相应 PCR管。
- d. 4°C 离心, 先使用 200 μL 移液器丢弃 90% 上清, 约留 10 μL , 再用 20 μL 移液器小心吸取剩余上清残留;
- e. 用 200 μL 移液器吸取 100 μL 抗体孵育 buffer沿 PCR管壁缓慢加入(勿用移液器吹打), 再加入 1 μL 一抗(移液器轻吹 3 下);
- f. 将 200 μL 移液器枪头在细胞稳定缓冲液中吸打 3 次, 使枪头被充分润洗, 移液器轻吹细胞 3 下, 使细胞分散均匀;
- g. 使用试管旋转混匀器, 4°C 孵育 3 小时, 转速 10 r/分钟;
- h. 孵育完毕后 4°C 离心, 先使用 200 μL 移液器丢弃 90%上清, 约留 10 μL , 再用 20 μL 移液器小心吸取剩余上清残留;
- i. 用 200 μL 移液器吸取 100 μL 抗体孵育 buffer, 沿 PCR管壁缓慢加入提前孵育完毕的二抗 & ChIP 转座酶混合液中, 用移液器混匀8-10下;
- j. 将步骤 i 稀释后的酶液加入细胞, 移液器轻吹 3 下, 使细胞分散均匀;
- k. 使用试管旋转混匀器 4°C, 孵育 60 分钟, 转速 10 r / 分钟。



3.3 染色质打断

- a. 孵育完毕后 4°C 离心, 先使用 200 μ L 移液器丢弃 90% 上清, 约留 10 μ L, 再用 20 μ L 移液器小心吸取剩余上清残留;
- b. 用 200 μ L 移液器吸取 200 μ L 转座酶 wash buffer, 沿 PCR 管壁缓慢加入, 将 200 μ L 移液器枪头在细胞稳定缓冲液中吸打 3 次, 使枪头被充分润洗, 移液器轻吹 3 下, 使细胞分散均匀, 使用试管旋转混匀器 4°C, 孵育 5 分钟, 转速 10 r/分钟。孵育完毕后 4°C 离心, 先使用 200 μ L 移液器丢弃 90% 上清, 约留 10 μ L, 再用 20 μ L 移液器小心吸取剩余上清残留;
- c. 重复上述步骤 b 一次;
- d. 用 20 μ L 移液器吸取 15 μ L 染色质打断 buffer, 沿 PCR 管壁靠下部分缓慢加入, 移液器轻吹 3 下, 使细胞分散均匀, 重悬细胞;
- e. PCR 仪 37°C 孵育, 45 分钟。

热 盖	反应体系	运行时间
40 °C	20 μ L	~ 45分钟
步骤	温度	时间
1	37 °C	45 分钟
2	8 °C	∞

3.4 回收细胞

- a. 将 PCR 结束后装有样本的 PCR 管置于冰上, 用 200 μ L 移液器吸取 135 μ L 预冷的 ChIP 细胞核悬浮液, 沿 PCR 管壁缓慢加入, 4°C 离心, 先使用 200 μ L 移液器丢弃 90% 上清, 约留 10 μ L, 再用 20 μ L 移液器小心吸取剩余上清残留;
- b. 用 200 μ L 移液器吸取 50 μ L 预冷的 ChIP 细胞核悬浮液重悬细胞, 移液器轻吹细胞 3 下;
- c. 准备一定数量待用的 200 μ L PCR 管, 用 200 μ L 移液器吸取 50 μ L 细胞稳定缓冲液加入管中, 上下颠倒数次, 使管盖及内壁被充分润洗, 瞬时离心, 用 200 μ L 移液器吸取 50 μ L 细胞稳定缓冲液, 丢弃, 将每个 PCR 管做好相应标记, 作为收集管;
- d. 将 200 μ L 移液器量程调至 70 μ L, 枪头在细胞稳定缓冲液中吸打 3 次, 使枪头被充分润洗, 吸取细胞悬液, 将细胞经 40 μ m 滤膜过滤 (枪头紧贴滤网), 用收集管收集;
- e. 取 5 μ L 细胞计数和质控 (细胞结团小于 10%, 细胞数大于 1000 个 / μ L)。



提示:

若通过 Countstar 等仪器进行细胞计数和质控 (标准操作为 10 μ L 样本 + 10 μ L AOPI), 此时可以取 5 μ L 样本 + 5 μ L ChIP 细胞核悬浮液 + 10 μ L AOPI, 最终样本真实细胞浓度为计数仪计数值的 2 倍。



图 3: 细胞冰上过滤

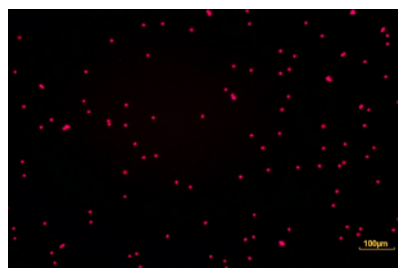


图 4: 细胞计数和质控

4. 液滴生成和单细胞标记

4.1 试剂准备

单细胞捕获试剂准备		存储温度	注意事项
B- ChIP微球	ChIP 微球	- 80 °C	提前 15 分钟进行室温解冻
C- 样品试剂	○ ChIP 细胞 (核) 悬浮液添加剂	室温	—
	● 细胞稳定剂	- 20 °C	冰上放置
	● ChIP 细胞 (核) 悬浮液	- 20 °C	冰上放置
D- 预扩增试剂	● ChIP 5 × 预扩增缓冲液	- 20 °C	冰上解冻
	● ChIP 预扩增增强剂	- 20 °C	冰上放置
	● ChIP 预扩增酶	- 20 °C	冰上解冻
	● ChIP 液滴稳定剂 T1	室温	—
	● ChIP 液滴稳定剂 T2	室温	—
E- 液滴生成油	● ChIP 液滴生成油	室温	

单细胞捕获芯片准备		存储温度	注意事项
芯片及配套部件	芯片 C	室温	—
	垫片 C	室温	—
	芯片支架	室温	—

按照下表提前自备试剂：

试剂	温度	用途
50% 甘油	室温	用于封堵无需使用的芯片通道

4.2 预扩增试剂配制

根据芯片使用通道数量需求, 依据下表在冰上配制单细胞预扩增试剂, 使用前将混合试剂颠倒混匀15次, 然后瞬时离心:

预扩增试剂	1.05 × (μL)	2.1 × (μL)	3.15 × (μL)	4.2 × (μL)
● ChIP 5 × 预扩增缓冲液	20.5	41	61.5	82
● ChIP 预扩增增强剂	4.1	8.2	12.3	16.4
● ChIP 预扩增酶	7.7	15.4	23.1	30.8
● ChIP 液滴稳定剂 T1	3.3	6.6	9.9	13.2
● ChIP 液滴稳定剂 T2	0.8	1.6	2.4	3.2
● 细胞稳定剂	0.8	1.6	2.4	3.2
NF-H ₂ O	46.8	93.6	140.4	187.2
合 计	84	168	252	336



注意:

预扩增试剂准备完成后, 用移液器吹打 15 次或者涡旋混匀, 然后瞬时离心, 尽快将混合试剂加入到芯片中, 以免影响试剂活性。

4.3 细胞相试剂配制

a. 根据实际样品的细胞浓度, 按照 3-4 万细胞上机量提前准备细胞悬液, 若细胞量 < 3 万,可全部上机;



提示:

配制 50 μL 细胞相, 上机 45 μL, 若实际细胞上机量为 4 万, 则细胞相配制时应加入 ~ 4.4 万细胞。

b. 按照下表将准备好的细胞悬液加入到 ChIP 细胞 (核) 悬浮液添加剂、ChIP 细胞 (核) 悬浮液和细胞稳定剂的混合液中。

序 号	细胞相试剂	1 × (μL)
1	● ChIP 细胞 (核) 悬浮液	42-N
2	● 细胞稳定剂	0.5
3	○ ChIP 细胞 (核) 悬浮液添加剂	7.5
4	细胞悬液	N
	合 计	50

**注意:**

- ① 细胞相试剂配置顺序 1-2-3-4, 加入细胞悬液前将 1-3 号混合试剂提前涡旋混匀, 瞬时离心后再加入细胞悬液;
- ② 细胞相试剂混匀时将移液器量程调至 45 μ L, 尽量使用枪头轻轻吹打混匀 6 次, 在细胞相试剂装载至芯片前, 再用枪头轻轻吹打混匀 2 次。

4.4 芯片准备和加样

4.4.1 芯片放置于芯片支架

将芯片支架平稳放置在试验台上, 取出芯片, 抓住芯片最右侧, 避免碰到上样孔, 根据芯片左侧字母 ABCDE 提示和支架左侧字母的对应关系, 将芯片倾斜抵住左侧支架活动开关, 将芯片轻轻向左推并缓慢向下放入芯片支架凹槽中, 确保芯片完全置入芯片凹槽内。

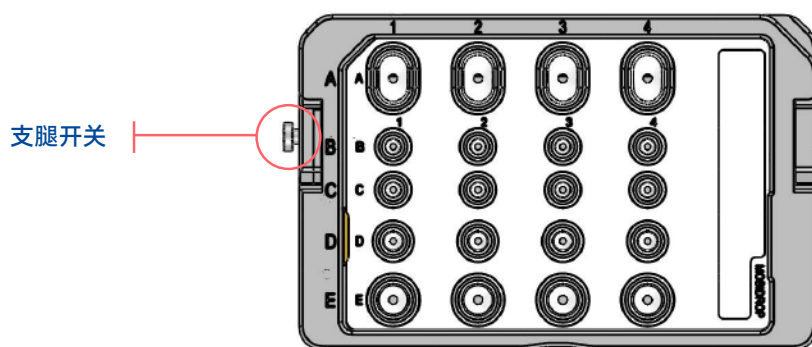


图 1: 芯片支架组装图

**注意:**

- ① 芯片包装打开后需当天使用完毕。如打开后没有立即使用, 需用洁净的垫片遮盖芯片, 避免空气中颗粒灰尘造成污染;
- ② 严禁接触芯片杯口和底部流道, 防止静电对油包水的生成产生影响;
- ③ 芯片暴露在空气中后, 尽量快速进行加样, 避免空气中颗粒灰尘的污染, 造成流道堵塞;
- ④ 若芯片无法准确卡进芯片支架, 重复尝试三次; 如若不行, 则更换芯片。

4.4.2 封堵无需使用的芯片通道

将 50% 甘油加入到无需使用的芯片通道上样孔 (B / C / D / E) 中。

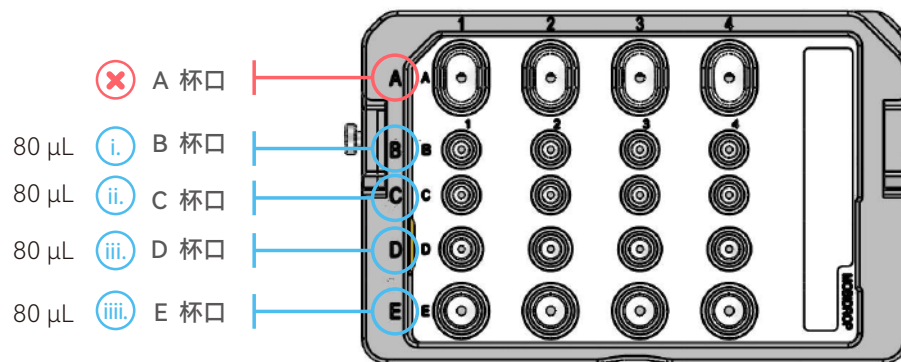


图 2: 芯片和支架展示

- i. 标记为 B 的杯口加入 80 μ L 50% 甘油;
- ii. 标记为 C 的杯口加入 80 μ L 50% 甘油;
- iii. 标记为 D 的杯口加入 80 μ L 50% 甘油;
- iv. 标记为 E 的杯口加入 80 μ L 50% 甘油。



注意:

A杯口请勿加入任何试剂。

4.4.3 芯片加样

向各芯片杯口中加入对应的试剂, BCDE 分别对应: ChIP 微球、细胞相试剂、预扩增试剂、液滴生成油。



注意:

- ① 加样时, 请勿随意移动芯片和芯片支架, 全程保持芯片水平放置以防止试剂溅出;
- ② 加样过程中应避免气泡产生。

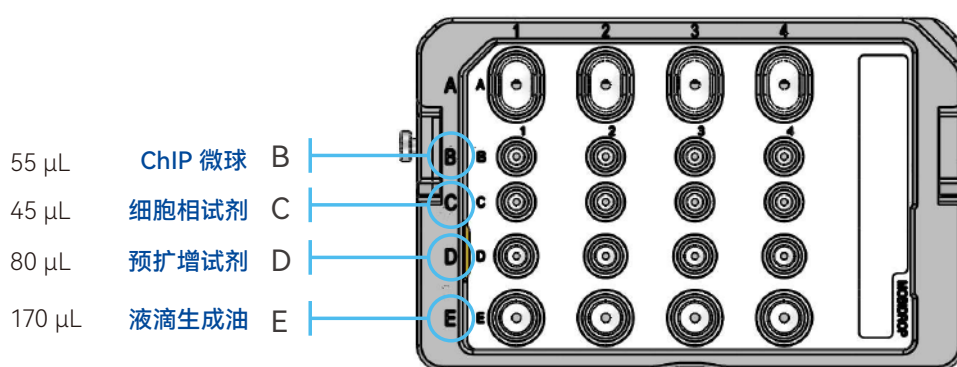


图 3: 芯片杯口展示图

- a. 提前 15 分钟取出 ChIP 微球解冻, 平衡至室温, 使用涡旋混匀仪震动混匀 ChIP 微球约 10 秒, 瞬时离心 10 秒;
- b. 缓慢吸出 55 µL ChIP 微球, 缓慢推出 (约 15 秒) 加入到标记为 B 的杯口中, 加样过程中应避免气泡产生;



提示:

在吸取微球时注意要缓慢吸液, 如果第一次吸液后枪头尖有空气, 可以缓慢下推移液器, 推走空气, 继续重新吸取微球, 反复几次直至枪头尖无空气存在, 即可进行加样。

- c. 将 45 µL 细胞相试剂缓慢加入到标记为 C 的杯口中, 避免气泡产生;
- d. 将 80 µL 预扩增试剂缓慢加入到标记为 D 的杯口中, 避免气泡产生;
- e. 将 170 µL 液滴生成油加入到标记为 E 的杯口中;
- f. 参照下图, 将硅胶垫片压在芯片杯口上方, 轻轻调整硅胶垫片位置, 确保垫片孔跟杯口一一对应。

**提示:**

避免接触垫片朝下的一面。

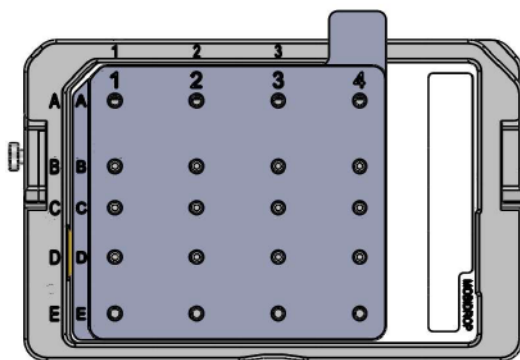


图 4: 加盖垫片

4.5 MobiNova®-100 运行

**警告:**

确保仪器已完成开机预热 10 分钟。

- a. 点击仪器屏幕“打开舱门”;

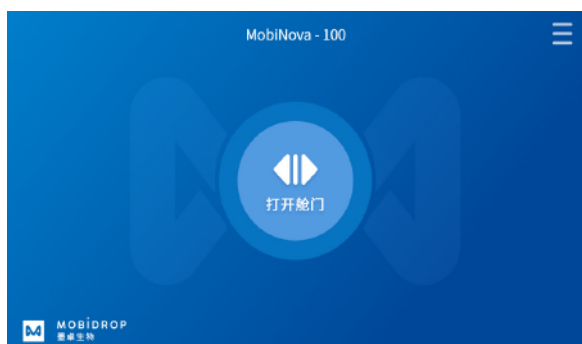


图 5: 打开舱门动画

- b. 将芯片支架缓缓放入芯片舱内, 用手轻轻按压四角, 确保芯片支架已平稳放入芯片舱内;

**注意:**

芯片支架转移至芯片舱过程中应保持水平, 以防止试剂溅出, 造成垫片润湿和试剂体积损耗。

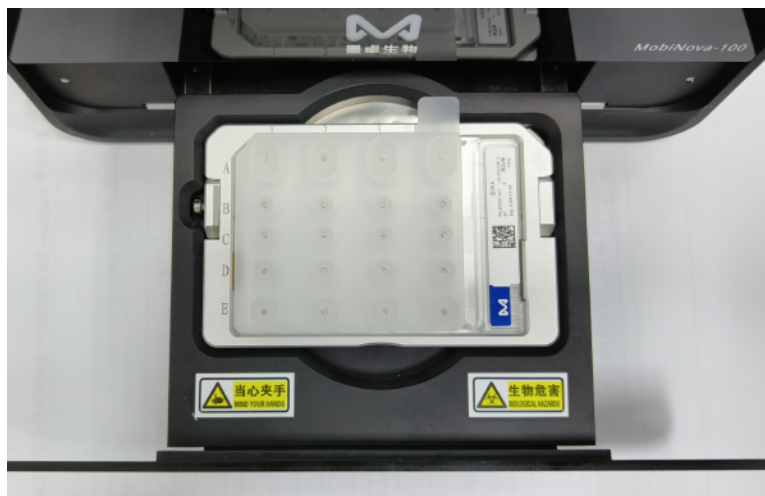


图 6: 放置芯片展示

c. 点击屏幕“关闭舱门”，完成芯片支架放入工作；



图 7: 关闭舱门动画

d. 仪器自动识别芯片类型与编号，跳出确认信息和实验开始确认按钮，确认无误后，点击“开始”进行实验；



图 8: 实验开始动画

- e. 随后主页面将显示本次实验时长及倒计时, 请等待至实验结束;

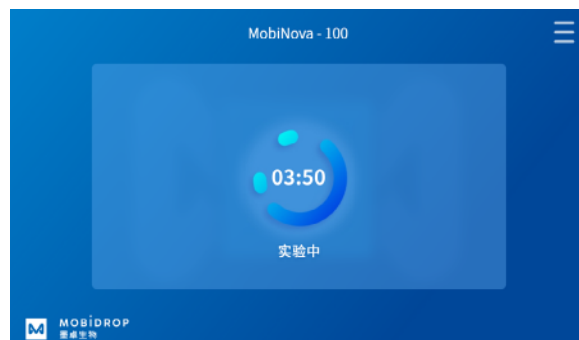


图 9: 实验倒计时动画

- f. 运行结束后点击屏幕“实验完成”按钮, 随即点击“打开舱门”;

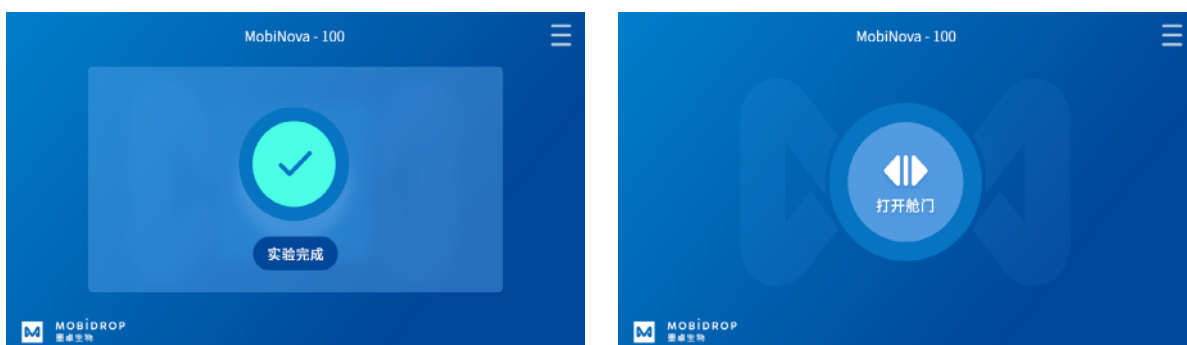


图 10: 打开舱门动画

- g. 捏住芯片支架上下两端凹槽, 将芯片支架从芯片舱中缓缓取出, 平稳的放到实验台面上, 缓缓去掉上侧覆盖的硅胶密封垫片。



图 11: 取出芯片支架

4.6 液滴转移

- a. 按压左侧金色支腿开关按钮, 当按钮按压进去后, 一只手压住支腿右上角, 缓缓向下抬芯片支架支腿, 打开至支腿自动锁死。
(长按左侧按钮, 直到芯片支架支腿稳定), 支架可平稳的支撑在实验台上;

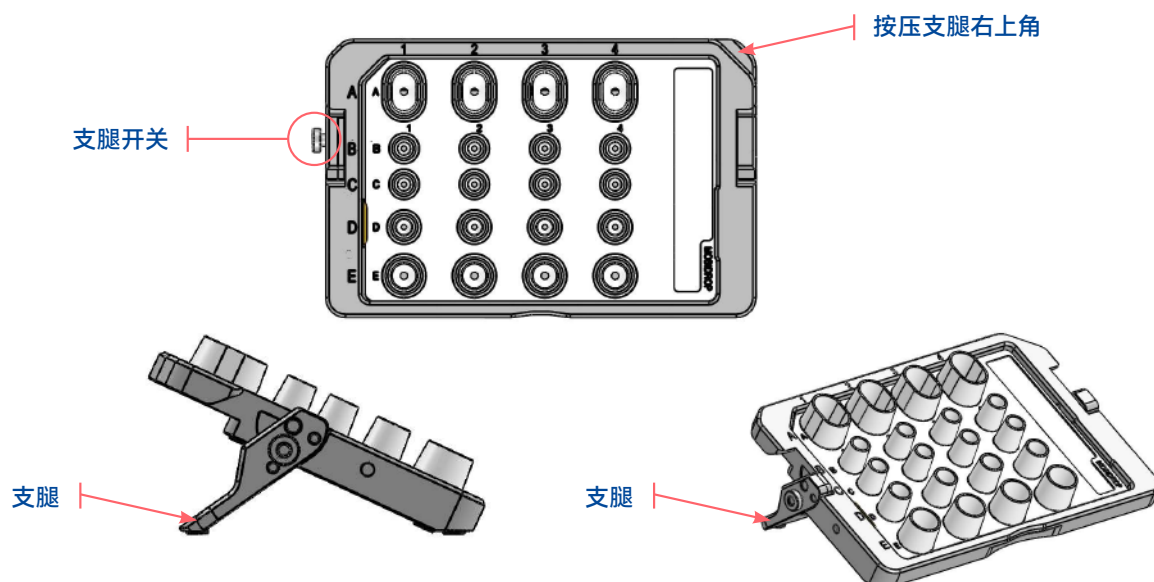


图 12: 开启芯片支架

- b. 准备 1.5 mL 低吸附离心管, 使用 200 μ L 广口低吸附枪头, 将量程调节至 70 μ L, 吸取芯片 A 杯口中透明底油, 缓慢转移至 1.5 mL 低吸附离心管内;



警告:

转移液滴时使用广口枪头操作。



图 13: 液滴转移图

**警告:**

- ① 吸取和打出液滴时需缓慢, 请勿使用枪头直接触底吸取, 适当于底部保持一定距离, 避免液滴破碎;
- ② 避免用手接触芯片杯口和收集液滴的 1.5 mL 离心管管壁。

- c. 缓慢吸取上层白色乳浊液液滴, 沿着管壁转移至 1.5 mL 低吸附离心管中 (过程中无需更换上述广口枪头), 直至液滴完全转移完毕;
- d. 转移完毕后, 将芯片向左向上轻轻推动, 然后倾斜着将芯片从支架上取出;
- e. 长按左侧开关, 待开关按压进去后缓缓将支腿放下, 芯片支架回到平坦放置状态。

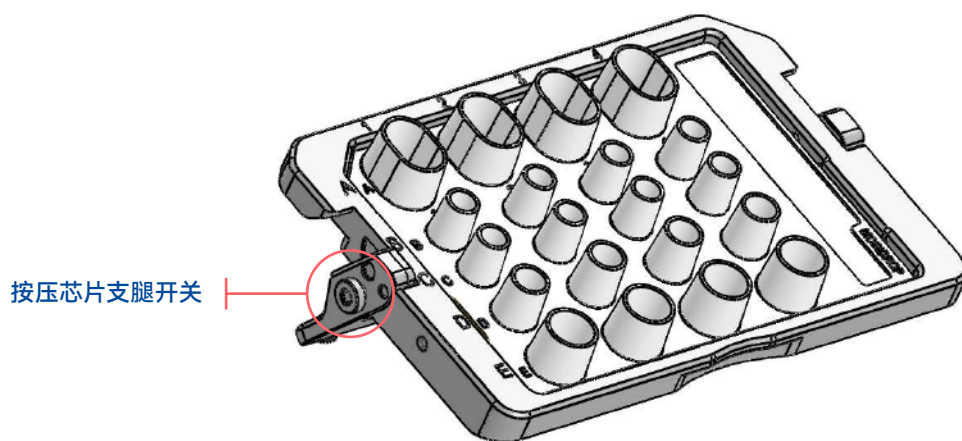


图 14: 芯片取出及支架恢复

4.7 液滴预处理

- a. 将装有乳浊液液滴的 1.5 mL 离心管, 小心地转移至液滴预处理器上, 平稳放置于孔内;

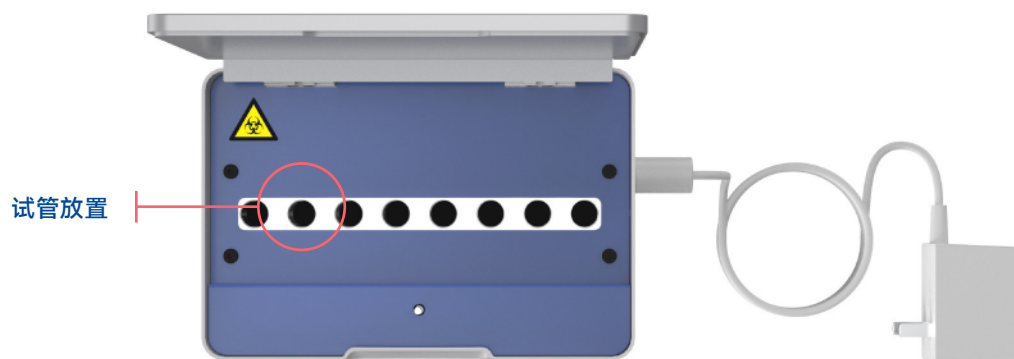


图 15: 液滴预处理器开盖图

- b. 按压图中开关按钮, 开启液滴预处理器, 蓝色指示灯闪烁; 运行结束时蓝色指示灯停止闪烁, 仪器发出“滴滴”的提示音;



警告:

仪器运行过程中请勿开盖, 运行耗时约 5 分钟。



图 16: 液滴预处理器正视图



提示:

仪器没有运行时是绿色指示灯常亮状态; 开启液滴预处理器, 运行仪器时是蓝色指示灯闪烁状态 (约 5 分钟); 运行结束时蓝色指示灯停止闪烁状态, 仪器发出“滴滴”的提示音。

- c. 打开盖子, 取出装有乳浊液液滴的 1.5 mL 离心管, 迅速进行**液滴预扩增**步骤。

4.8 液滴预扩增

a. 准备 2 个 0.2 mL PCR 管;



警告:

- ① 转移液滴时使用广口枪头操作;
- ② 避免用手接触收集液滴的 1.5 mL 离心管管壁。

b. 调节 200 μ L 移液枪量程至 70 μ L, 使用广口枪头将底部透明底油尽量吸除干净;

c. 不更换枪头, 缓慢吸取上层乳浊液, 2 个 0.2 mL PCR 管内各加入 70 μ L, 加入乳浊液时注意沿 PCR 管壁缓慢加入, 并将剩余乳浊液和油平均分至 2 个 0.2 mL PCR 管内;

d. 调节 200 μ L 移液枪量程至 80 μ L, 使用广口枪头吸取 ChIP 液滴保护剂, 缓慢转移至步骤 c 的 0.2 mL 的 PCR 管中, 覆盖在液滴之上。



提示:

- ① 0.2 mL PCR 管内液体略大于 70 μ L 不会影响后续实验结果, 但不要超过 100 μ L;
- ② 转移乳浊液液滴时尽量避免吸到底油, 但 0.2 mL PCR 管内包含少量下层油不会影响后续实验结果。

e. 将 0.2 mL PCR 管平稳转移到 PCR 仪上, 按照以下程序, 进行预扩增反应, 循环数为 16 cycles (耗时约 1 小时 5 分钟)

热 盖	反应体系	运行时间
105 $^{\circ}$ C	100 μ L	~ 65分钟
步骤	温度	时间
1	72 $^{\circ}$ C	10 分钟
2	98 $^{\circ}$ C	3 分钟
3 a	98 $^{\circ}$ C	20 秒
3 b	55 $^{\circ}$ C	1 分钟
	72 $^{\circ}$ C	1 分钟
4	72 $^{\circ}$ C	5 分钟
5	8 $^{\circ}$ C	∞



停止点:

在 -80 $^{\circ}$ C 条件下可保存 1 周; 或继续进行下一步实验。

5. 预扩增后样品处理

5.1 试剂准备

破乳回收试剂准备		存储温度	注意事项
破乳回收试剂	回收剂	室温	—
	ChIP 5 × 重悬缓冲液	- 20 °C	配置成 1 × 重悬缓冲液, 备用

回收滤芯准备		存储温度	注意事项
回收滤芯	滤芯	室温	—

按照下表提前准备试剂:

试剂	温度	用途
NF-H ₂ O	室温	用于稀释重悬缓冲液和重悬预扩增后的纯化产物
1 × 重悬缓冲液	室温	用于过滤后滤芯的清洗
SPRIselect beads	室温	室温平衡, 震荡混匀后用于扩增产物的纯化
80% 乙醇	室温	新鲜配置, 用于扩增产物的纯化

5.2 破乳

a. 按照下表稀释预扩增试剂盒内 5 × 重悬缓冲液:

重悬缓冲液试剂	1.1 × (μL)	终浓度
NF-H ₂ O	88	—
5 × 重悬缓冲液	22	1 ×
总计	110	

b. 如果含预扩增产物的 0.2 mL PCR 管保存在 - 80 °C, 提前取出 0.2 mL PCR 管, 置于 4 °C 解冻;

c. 待预扩增产物完全解冻后, 瞬时离心 10 秒;

d. 吸走上层液滴保护剂;

- e. 每管加入 100 μ L 回收剂, 加入 50 μ L 1 \times 重悬缓冲液, 颠倒混匀后, 瞬时离心 10 秒 (0.2 mL PCR管);
- f. 将 2 个 0.2 mL PCR样本管中的上层乳浊液转移至同一滤芯上 (下图 1 转移至滤芯);
- g. 继续往 2 个 0.2 mL PCR样本管加入 50 μ L 1 \times 重悬缓冲液, 颠倒混匀后, 瞬时离心 10 秒 (0.2 mL PCR管), 放置待用。

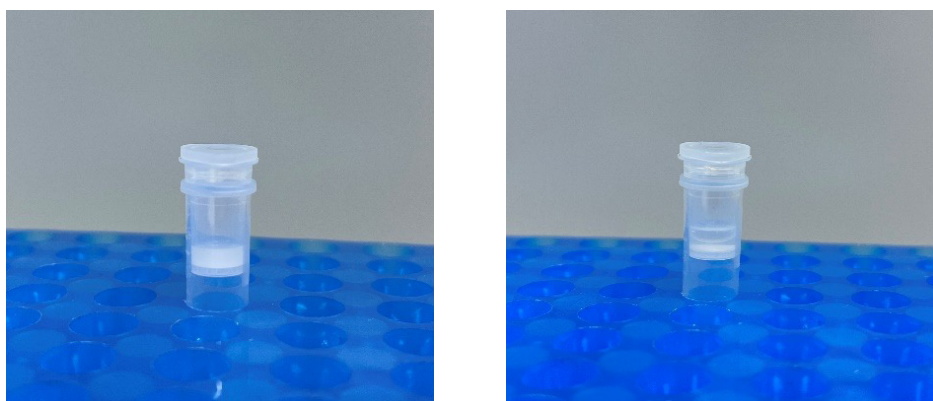


图 1: 转移至滤芯

5.3 过滤及清洗

- a. 将含液体的滤芯放入高速离心机内, 10000 rcf 离心 5 分钟, 离心完成后如果滤芯内仍有液体残留, 可忽略继续往下实验;
- b. 将 200 μ L 的移液器量程调节至 80 μ L, 转移步骤 5.2 g 2 个 0.2 mL PCR样本管的上层液体至相应滤芯, 吹打滤芯内液体 10 次;



提示:

- ① 避免移液器枪头接触滤芯的滤膜;
- ② 拿取滤芯过程中避免只抓取滤芯盖子, 防止滤芯盖子断裂。

- c. 将 b 中滤芯放入高速离心机内, 再 10000 rcf 离心 5 分钟, 离心完成后如果滤芯内仍有液体残留, 可扭转滤芯方向重复离心 1~2 次, 至滤芯内无明显液体残留即可;
- d. 丢弃滤芯滤膜, 使用滤芯收集管内液体用于预扩增产物纯化。

5.4 预扩增产物纯化

- 将 SPRIselect beads 涡旋震动充分混匀;
- 若滤芯底部有明显分界的油相, 则用 20 μ L 移液器沿管壁插入底部, 取出底部油相并丢弃;
- 用 1 mL 移液器量滤液体积, 加入等量 (1.0 \times) SPRIselect beads, 置于涡旋混匀仪上轻轻震动混匀 10 下;
- 室温孵育 5 分钟;
- 瞬时离心收集管, 置于 1.5 mL 磁力架上静置 5 分钟;
- 弃除上清液, 避免吸取到磁珠;
- 将收集管静置于磁力架上, 加入 500 μ L 新鲜配制的 80 % 乙醇 (沿磁珠的对壁加入, 切勿碰到磁珠), 静置 30 秒, 弃除上清液;
- 重复步骤 g 两次;
- 将离心管瞬时离心, 用 20 μ L 移液器去除管内剩余的 80% 乙醇, 可反复多次, 至无明显液体残留;
- 打开收集管盖晾干磁珠 (约 3-5 分钟), 直至磁珠表面无水光反射, 同时避免过度干燥导致磁珠开裂;
- 从磁力架上取下收集管, 立即加入 23 μ L NF-H₂O;
- 将 200 μ L 的移液器量程调节至 21 μ L, 吹打 15 次, 将磁珠与液体完全混匀;
- 室温孵育 5 分钟;
- 瞬时离心, 将收集管放回磁力架静置, 直至溶液变澄清 (约 3 分钟);
- 转移 21 μ L 洗脱液至新 0.2 mL PCR 管中, 并放置于冰上。



提示:

总计 21 μ L 洗脱液于 0.2 mL PCR 管作为建库的模板。



停止点:

在 -20°C 条件下可保存 4 周; 或继续进行下一步实验。

6. 文库构建

6.1 试剂准备

单细胞ChIP文库构建试剂准备		存储温度	注意事项
建库PCR试剂	○ ChIP 2 × 扩增混合液	- 20 °C	冰上解冻
	● ChIP 扩增引物C-N	- 20 °C	冰上解冻, 记录使用编号

按照下表提前准备试剂:

试 剂	温 度	用 途
1 × TE缓冲液	室温	用于重悬文库分选的纯化产物
SPRIselect beads	室温	用于扩增产物的纯化
80% 乙醇	室温	用于扩增产物的纯化
Qubit™ 1 × dsDNA 试剂盒	4 °C	用于纯化产物的定量

6.2 文库标签扩增


- 在冰上向含有纯化扩增产物 (21 μL) 的样品管中加入 25 μL ChIP 2 × 扩增混合液;
- 在冰上向每个样品中继续加入 4 μL ChIP扩增引物 C-N, 将移液器调节至 40 μL, 吹打混匀 15 次 (缓慢吹打, 避免气泡);



注意:

记录每个样品的 ChIP 扩增引物C-N编号, 避免出现交叉污染。

c. 进行 PCR 扩增, 程序如下:

热 盖	反应体系	运行时间
105 °C	50 µL	45~60 分钟
步骤	温度	时间
1	98 °C	3 分钟
	2	98 °C
	3	58 °C
	4	72 °C
步骤 2-4 为循环, 循环数参考下表		
5	72 °C	5 分钟
6	8 °C	∞

抗 体	细胞系循环数	组织细胞循环数	原代细胞/PBMC循环数
H3K27ac 和 H3K4me1	14	15	16
H3K4me3 和 H3K27me3	15	16	17
H3K36me3 和 Rpb1	16	18	19



停止点:
在 -20° C 下可保存 4 周, 或继续下一步实验。

6.3 文库片段分选

- 将 SPRIselect beads 涡旋震动充分混匀;
- 向文库扩增产物的PCR管中加入 20 μL (0.4 \times) SPRIselect beads, 涡旋震动混匀 10 下;
- 室温孵育 5 分钟;
- 瞬时离心后, 将PCR管放置于 0.2 mL 磁力架上静置, 直至溶液澄清 (约 3 分钟);
- 将移液器量程调节至 80 μL , 转移上清液至新 0.2 mL PCR 管中;



注意:

此步转移上清液, 切勿丢弃!

- 向e中的PCR管中再加入 25 μL (0.5 \times) SPRIselect beads, 涡旋震动混匀10下;
- 室温孵育 5 分钟;
- 瞬时离心, PCR管放置于磁力架上静置, 直至溶液变澄清 (约 3 分钟);
- 弃上清液 (避免吸到磁珠);
- 将 PCR管静置于磁力架上, 加入 200 μL 新鲜配置的 80 % 乙醇 (沿磁珠的对壁加入, 切勿碰到磁珠), 弃上清液;
- 重复步骤j 一次;
- 将离心管瞬时离心, 用 20 μL 移液器去除管内剩余80%乙醇, 可反复多次, 至无明显液体残留;
- 打开PCR管盖晾干磁珠 (约 1-2 分钟), 直至磁珠表面无水光反射, 同时避免过度干燥导致磁珠开裂;
- 立即从磁力架取下PCR管, PCR管内加入 22 μL 1 \times TE缓冲液;
- 将 20 μL 移液器量程调至 20 μL , 吹打混匀 15 次, 直至磁珠完全在液体中混匀;
- 室温孵育 3 分钟;
- 瞬时离心, 将PCR管放回至磁力架静置, 直至溶液澄清 (约 3 分钟);
- 转移 20 μL 洗脱液至新 0.2 mL PCR 管或1.5 mL 离心管。



停止点:

在 -20°C 条件下长期储存。

6.4 文库质检

- a. 取 1 μ L 文库纯化产物进行 Qubit 浓度测定;
- b. 取 1 μ L 样品, 可根据 a 中测定浓度稀释样品, 进行安捷伦 2100 HS DNA 质检分析;

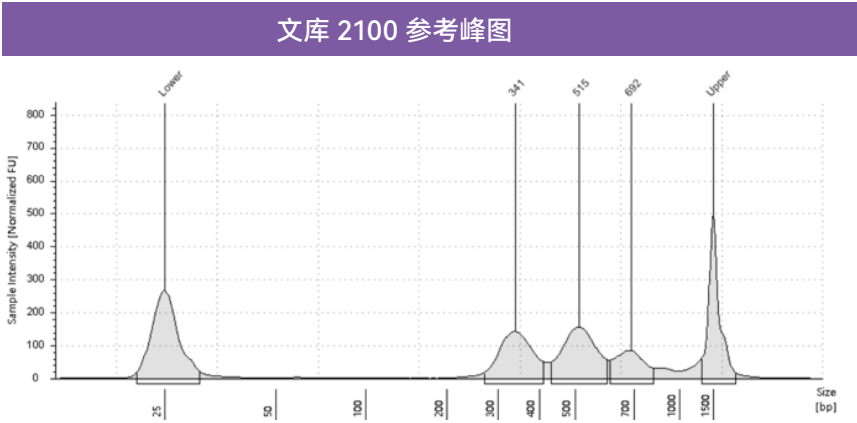



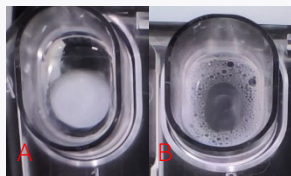


图 1: 文库2100质检参考图

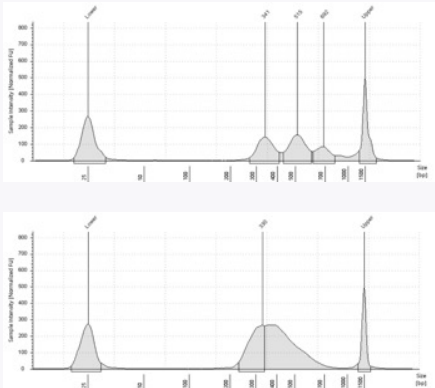
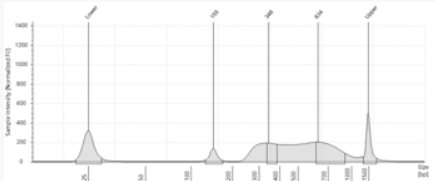
- c. 选择合格文库进行下一步测序, 测序平台推荐 NovaSeq S4, 测序类型选择 PE 150。
- d. 测序量一般要求如下表所述。

抗原表位	测序量
H3K27ac	35 G
H3K4me1	35 G
H3K27me3	35 G
H3K4me3	20 G
H3K36me3	20 G
Rpb1	10 G

附录

Troubleshooting

问题描述	正常状态描述	异常状态描述
a.一抗孵育完毕后, 样品管中细胞状态	样品管中细胞混合均匀, 无结团细胞	样品管中细胞出现结团
异常处理方法:	再次核对上机前细胞状态, 将 200 μ L 移液器枪头在细胞稳定缓冲液中吸打 3 次, 使枪头被充分润洗, 移液器轻吹细胞 3 下, 使细胞分散均匀。	
b.上机后, 生成油包水液滴状态	 <p>液滴大部分呈乳白色, 均匀分布</p>	 <p>A:生成少量液滴, 表示试剂堵塞通道 B:生成液滴异常, 表示油包水失败</p>
异常处理方法:	停止进行后续实验, 复核细胞结团率是否 > 10% 或存在直径大于 40 μ m 的细胞结团。如果是, 对细胞进行过滤处理, 重新上机; 如果不是, 直接重新上机。如果仍然出现上述异常现象, 记录异常芯片的 LN 编号和 Mobicube ChIP-seq 预扩增试剂盒 LN 编号, 反馈给 support@mobidrop.com 邮箱后等待技术支持联系您。	
c.过滤后, 滤芯的液体剩余状态	 <p>芯上无液体残留, 滤膜干燥</p>	 <p>滤芯有液体残留, 滤膜上可见明显的液体</p> <p>影响: 造成预扩增产物回收量降低</p>
异常处理方法:	按照 5.3 过滤及清洗标准操作后, 滤芯内仍然有液体残留时, 扭转离心管方向, 继续 10000 rcf 离心 5 分钟。如果滤芯内仍然有液体残留, 则重复该步骤, 直到滤芯内液体无残留或残留量 < 10 μ L, 即可进行后续实验。	

问题描述	正常状态描述	异常状态描述
d. 常规测序文库峰图	<p>文库有驼峰, 无引物二聚体或接头污染</p> <p>文库质检: 因组织类型或者抗体不一样, 以下两种峰图均为正常峰形</p> 	<p>文库有驼峰, 但有明显的引物二聚体或接头污染</p> <p>文库质检:</p>  <p>影响:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1.文库存在引物二聚体或接头污染, 会降低测序文库质量。 2.测序文库存在引物二聚体或接头污染, 会影响测序数据质量。
异常处理方法:	<p>对于存在引物二聚体或接头污染的文库, 需要进行二次纯化。二次纯化具体步骤如下:</p> <ol style="list-style-type: none"> a. 将文库片段分选产物转移至 200 μL PCR管中, 加入1 \times TE Buffer 至总体积为 50 μL; b. 涡旋震动充分混匀 SPRIselect beads; c. 将 27.5 μL (0.55 \times) SPRIselect beads 加入到文库片段分选产物的PCR管中, 置于涡旋混匀仪上, 轻轻震动 10 下进行混匀; d. 室温孵育 5 分钟; e. 瞬时离心, 离心管置于 200 μL 磁力架上静置, 直至溶液变澄清 (约 3 分钟); f. 将移液器量程调节至 80 μL, 转移上清液至新 0.2 mL PCR 管中, 弃磁珠; g. 向 f 中的PCR管中再加入 32.5 μL (0.65 \times) SPRIselect beads, 涡旋震动混匀 10 下; h. 室温孵育 5 分钟; i. 瞬时离心, PCR管放置于磁力架上静置, 直至溶液变澄清 (约 3 分钟); j. 弃上清液 (避免吸到磁珠); k. 将 PCR管静置于磁力架上, 加入 200 μL 新鲜配置的 80 % 乙醇, 静置 30 秒, 弃上清液; l. 重复步骤 k 一次; m. 用 20 μL 移液器去除管内剩余 80% 乙醇, 可反复多次, 至无明显液体残留; n. 打开 PCR管盖晾干磁珠 (约 1-2 分钟), 直至磁珠表面无水光反射, 同时避免过度干燥导致磁珠开裂; o. 立即从磁力架取下 PCR管, PCR管内加入 22 μL 1 \times TE缓冲液; p. 将20 μL移液器量程调至 20 μL, 吹打混匀 15 次, 直至磁珠完全在液体中混匀; q. 室温孵育 3 分钟; r. 瞬时离心, 将PCR管放回至磁力架静置, 直至溶液澄清 (约 3 分钟); s. 转移 20 μL 洗脱液至新 0.2 mL PCR 管或1.5 mL 离心管, 进行文库质检后送测。 	

MobiCube® ChIP-seq Dual Index 套装 Index 列表

Index编号	P 5 Index序列	P 7 Index序列
ChIP 扩增引物 C-1	CTCCTTAC	GGAGCTAC
ChIP 扩增引物 C-2	CTCCTTAC	GCGTAGTA
ChIP 扩增引物 C-3	CTCCTTAC	CGGAGCCT
ChIP 扩增引物 C-4	CTCCTTAC	TACGCTGC
ChIP 扩增引物 C-5	TATGCAGT	GGAGCTAC
ChIP 扩增引物 C-6	TATGCAGT	GCGTAGTA
ChIP 扩增引物 C-7	TATGCAGT	CGGAGCCT
ChIP 扩增引物 C-8	TATGCAGT	TACGCTGC
ChIP 扩增引物 C-9	TACTCCTT	GGAGCTAC
ChIP 扩增引物 C-10	TACTCCTT	GCGTAGTA
ChIP 扩增引物 C-11	TACTCCTT	CGGAGCCT
ChIP 扩增引物 C-12	TACTCCTT	TACGCTGC
ChIP 扩增引物 C-13	AGGCTTAG	GGAGCTAC
ChIP 扩增引物 C-14	AGGCTTAG	GCGTAGTA
ChIP 扩增引物 C-15	AGGCTTAG	CGGAGCCT
ChIP 扩增引物 C-16	AGGCTTAG	TACGCTGC

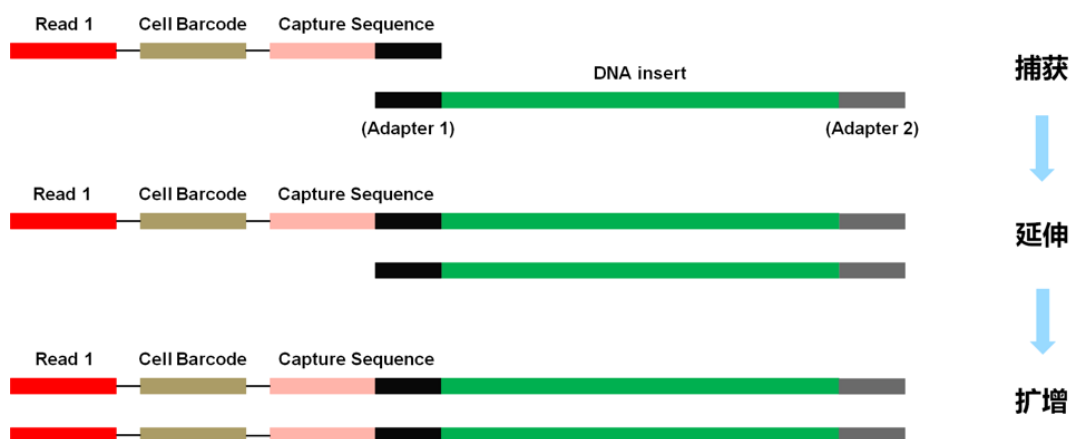


提示:

本试剂盒 index 适配测序平台为 iSeq100, MiniSeq, NextSeq, HiSeqX, HiSeq 3000 / 4000 和 NovaSeq 6000 (v 1.5) 正常填写; 若采用 Miseq, Hiseq 2000 / 2500, MiniSeq (Rapid) and NovaSeq 6000 (v 1.0) 等平台需将以上的 i5 序列反向互补, i7不变。

测序文库原理示意图:

液滴内预扩增



测序文库构建



测序文库结构示意图





了解更多产品讯息及操作说明,
请关注墨卓生物微信公众号

联系我们 CONTACT US

生产企业：墨卓生物科技（浙江）有限公司

生产地址：浙江省嘉兴市桐乡市乌镇镇龙翔大道1888号（墨卓生物）

联系电话：400-860-7763

邮箱：support@mobidrop.com

网 址：www.mobidrop.com

版权所有©2023 墨卓生物科技（浙江）有限公司保留所有权利。

本手册仅限科研目的使用，未经墨卓生物科技（浙江）有限公司书面同意，任何单位或个人不得擅自摘抄、复制本资料内容的全部或部分，并不得以任何形式传播。

MOBIDROP