

SOP-05-1001 v2.1 Rev B

MobiCube®

高通量单细胞 3' 转录组试剂 v2.1

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	04

1. 简 介

1.1	MobiCube® 高通量单细胞 3' 转录组套装 v2.1	06
1.2	MobiCube® 芯片 A 单细胞套装 v2.1	07
1.3	MobiCube® 3' Dual Index 套装 v2.1	08
1.4	推荐使用耗材 / 试剂 / 设备列表	09
1.5	实验流程时间表	11
1.6	试剂预准备	12

2. 液滴生成和单细胞标记

2.1 试剂准备	13
2.2 反转录试剂准备	14
2.3 细胞相试剂准备	14
2.4 芯片准备和加样	17
2.5 MobiNova®-100 运行	20
2.6 液滴转移	23
2.7 液滴预处理	25
2.8 液滴反转录	26

3. 反转录后样品处理和 cDNA 扩增

3.1 试剂准备	27
3.2 破乳	28
3.3 过滤及清洗	28
3.4 反转录产物纯化	29
3.5 预扩增	30
3.6 预扩增产物纯化	31
3.7 cDNA 质检	32



4. 文库构建

4.1 试剂准备	33
4.2 cDNA 片段化	34
4.3 片段化产物接头连接	35
4.4 连接产物分选	36
4.5 文库标签扩增	37
4.6 文库片段分选	38
4.7 文库质检	39

5. 附录

Troubleshooting	40
附录	44

I 前言

I 文档信息

文档版本号: SOP-05-1001 v2.1 Rev B

文档名称: **MobiCube® 高通量单细胞 3' 转录组试剂 v2.1 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 3' 转录组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 3' 转录组试剂 v2.1



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 3' 转录组套装 v2.1

▪ PN - S050200301

MobiCube® 高通量单细胞 3' 转录组套装		微球 & 反转录 & 建库 - 4 rxn	
	组 分	数 量	货 号
MobiCube® 3' 转录组微球试剂盒 v2.1 PN-S050400301 (储存温度 -80℃)	● 3' 转录组微球 v2.1	4	SPS051330
	○ 反转录引物 v2.1	1	SPS051131
MobiCube® 3' 转录组反转录试剂盒 v2.1 PN-S050500301 (储存温度 -20℃)	● 反转录缓冲液 v2.1	1	SPS051132
	● 反转录酶混合液 v2.1	1	SPS051133
	● 反转录增强剂 v2.1	1	SPS051134
	滤芯(单独包装, 常温保存) v2.1	5	SPS051135
MobiCube® 3' 转录组建库试剂盒 v2.1 PN-S050600301 (储存温度 -20℃)	○ 5× 重悬缓冲液 v2.1	1	SPS051136
	● 预扩增引物 v2.1	1	SPS051137
	● 2× 预扩增混合液 v2.1	1	SPS051138
	● 片段化缓冲液 v2.1	1	SPS051139
	● 片段化酶 v2.1	1	SPS051140
	● 连接酶 v2.1	1	SPS051141
	● 连接缓冲液 v2.1	1	SPS051142
	● 接头 v2.1	1	SPS051143
	○ 扩增混合液v2.1	1	SPS051144



■ PN - S050200302

MobiCube® 高通量单细胞 3' 转录组套装		微球 & 反转录 & 建库 - 16 rxn	
组 分		数 量	货 号
MobiCube® 3' 转录组微球试剂盒 v2.1 PN-S050400302 (储存温度 -80℃)	● 3' 转录组微球 v2.1	16	SPS051330
	○ 反转录引物 v2.1	1	SPS051331
MobiCube® 3' 转录组反转录试剂盒 v2.1 PN-S050500302 (储存温度 -20℃)	● 反转录缓冲液 v2.1	1	SPS051332
	● 反转录酶混合液 v2.1	1	SPS051333
	● 反转录增强剂 v2.1	1	SPS051334
	滤芯(单独包装, 常温保存) v2.1	20	SPS051335
MobiCube® 3' 转录组建库试剂盒 v2.1 PN-S050600302 (储存温度 -20℃)	○ 5× 重悬缓冲液 v2.1	1	SPS051336
	● 预扩增引物 v2.1	1	SPS051337
	○ 2× 预扩增混合液 v2.1	1	SPS051338
	● 片段化缓冲液 v2.1	1	SPS051339
	● 片段化酶 v2.1	1	SPS051340
	● 连接酶 v2.1	1	SPS051341
	● 连接缓冲液 v2.1	1	SPS051342
	● 接头 v2.1	1	SPS051343
	○ 扩增混合液v2.1	1	SPS051344

1.2 MobiCube® 芯片 A 单细胞套装 v2.1

■ PN - S050100301

MobiCube® 芯片 A 单细胞套装 - 8 rxn		
组 分	数 量	货 号
芯片 A v2.1	2	SPS051412
垫片 A v2.1	2	SPS051413
○ 液滴生成油 v2.1	1	SPS051414
● 回收剂 v2.1	1	SPS051209
● 细胞悬浮液添加剂 v2.1	1	SPS051210

■ PN - S050100302

MobiCube® 芯片 A 单细胞套装 - 32 rxn		
组 分	数 量	货 号
芯片 A v2.1	8	SPS051412
垫片 A v2.1	8	SPS051413
○ 液滴生成油 v2.1	4	SPS051414
● 回收剂 v2.1	2	SPS051415
○ 细胞悬浮液添加剂 v2.1	1	SPS051416

1.3 MobiCube® 3' Dual Index 套装

■ PN -S050300301

MobiCube® 3' Dual Index 套装 - 96 rxn		
组 分	数 量	货 号
3' dual index-A	1	SPS051602-A
3' dual index-B	1	SPS051602-B
3' dual index-C	1	SPS051602-C
3' dual index-D	1	SPS051602-D
3' dual index-E	1	SPS051602-E
3' dual index-F	1	SPS051602-F
3' dual index-G	1	SPS051602-G
3' dual index-H	1	SPS051602-H
3' dual index-I	1	SPS051602-I
3' dual index-J	1	SPS051602-J
3' dual index-K	1	SPS051602-K
3' dual index-L	1	SPS051602-L

1.4 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	SARSTEDT	72.737.002
3	0.2 mL 八连排 PCR 管	SARSTEDT	72.991.002
4	移液枪枪头	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	UltraPure™ 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	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	移液枪	Pipet-Lite MuLti Pipette L8-50XLS+	17013804
		Pipet-Lite MuLti Pipette L8-200XLS+	17013805
		Pipet-Lite MuLti Pipette L8-10XLS+	17013802
		Pipet-Lite MuLti Pipette L8-20XLS+	17013803
		Pipet-Lite LTS Pipette L-2XLS+	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

1.5 实验流程时间表

时间节点	步 骤	操作步骤	消耗时间	
1 小时 26 分钟	步骤 1: 液滴生成和单细胞 标记	芯片准备	10 分钟	
		MobiNova®-100 运行	6 分钟	
		液滴预处理	5 分钟	
		液滴反转录	65 分钟	 停止点: 4°C ≤ 24 小时或 -20°C ≤ 1 周 或 -80°C ≤ 1 周
3 小时 20 分钟	步骤 2: 反转录后样本处理 和 cDNA 预扩增	破乳、过滤和清洗	20 分钟	
		反转录产物纯化	20 分钟	
		cDNA 预扩增	1.5 小时	 停止点: 4°C ≤ 72 小时
		cDNA 产物纯化	20 分钟	 停止点: 4°C ≤ 72 小时或 -20°C ≤ 4 周
		cDNA 质检	50 分钟	
3 小时 20 分钟	步骤 3: 文库构建	cDNA 片段化	45 分钟	
		片段化产物接头连接	15 分钟	
		连接产物分选	30 分钟	
		文库标签扩增	40 分钟	 停止点: 4°C ≤ 72 小时
		文库片段分选	30 分钟	 停止点: 4°C ≤ 72 小时或 -20°C ≤ 4 周
		文库质检	40 分钟	

1.6 试剂预准备

a. 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。

b. DNA Elution Buffer

无核酸酶水 (NF-H₂O)、1 M Tris-HCl (pH 8.0) 和 0.5 M EDTA (pH 8.0), 按照下表配方配制 DNA Elution Buffer:

DNA Elution Buffer 配方	体积 (μL)	终浓度
NF-H ₂ O	4949	/
1 M Tris-HCl (pH 8.0)	50	10 mM
0.5 M EDTA (pH 8.0)	1	0.1 mM
总 计	5000	



提示:

配制好的DNA Elution Buffer使用 1.5 mL 低吸附离心管分装, 储存在-20°C环境下; 使用前需平衡至室温。

2. 液滴生成和单细胞标记

2.1 试剂准备

单细胞捕获试剂准备		存储温度	注意事项
B-3' 转录组微球	● 3' 转录组微球 v2.1	-80°C	提前 15 分钟进行室温解冻
C- 样品试剂	● 细胞悬浮液添加剂 v2.1	室温	—
	● 反转录增强剂 v2.1	-20°C	冰上放置
D- 反转录试剂	● 反转录缓冲液 v2.1	-20°C	冰上解冻
	● 反转录酶混合液 v2.1	-20°C	冰上放置
	○ 反转录引物 v2.1	-80°C	冰上解冻
E- 液滴生成油	液滴生成油 v2.1	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 A v2.1	室温	—
	垫片 A v2.1	室温	—
	芯片支架	室温	—

■ 按照下表提前自备试剂：

试剂	温度	用途
PBS缓冲液	4°C	用于重悬样品
1640培养基	4°C	用于重悬样品
50% 甘油	室温	用于封堵无需使用的芯片通道

2.2 反转录试剂准备

根据芯片使用通道数量需求, 依据下表在冰上配制单细胞反转录试剂, 使用前将各个试剂用手指轻弹颠倒混匀5次, 然后瞬时离心:

反转录试剂	1.1× (μL)	2.2× (μL)	3.3× (μL)	4.4× (μL)
反转录缓冲液 v2.1	53.8	107.6	161.4	215.2
反转录酶混合液 v2.1	30.0	60.0	90.0	120.0
反转录引物 v2.1	4.2	8.4	12.6	16.8
合 计	88	176	264	352



注 意:

反转录试剂准备完成后, 用移液枪吹打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。

2.3 细胞相试剂准备

- 根据期望的细胞捕获量和实际样品的细胞浓度, 按照细胞悬液配制表提前准备细胞悬液;
- 按照下表将准备好的细胞悬液加入到 PBS缓冲液或 1640培养基、细胞悬浮液添加剂和反转录增强剂的混合液中。

序 号	细胞相试剂	1.1× (μL)
1	细胞悬浮添加剂 v2.1	7.5
2	反转录增强剂 v2.1	1
3	PBS缓冲液或 1640培养基	41-N
4	细胞悬液	N
	合 计	49.5



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枪量程调至 45 μL, 尽量使用广口枪头轻轻吹打混匀 5-10 次, 在细胞相试剂装载至芯片前, 再用广口枪头轻轻吹打混匀 5-10 次;
- ③ 细胞悬液加样量N根据细胞悬液配置表加入相应的体积;
- ④ 必须使用不含钙、镁离子的 PBS缓冲液或 1640培养基。

■ 细胞悬液配制表

细胞浓度 (个/ μL)	细胞捕获量												
	500	1000	2000	3000	4000	5000	6000	7000	8000	9000	10000	11000	12000
100	13.75 27.25	27.50 13.50	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
200	6.88 35.50	13.75 27.75	27.50 13.50	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
300	4.58 36.42	9.17 31.83	18.33 22.67	27.50 13.50	36.67 4.33	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
400	3.44 37.56	6.88 34.13	13.75 27.25	20.63 20.38	27.50 13.50	34.38 6.63	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
500	2.75 38.25	5.50 35.50	11.00 30.00	16.50 24.50	22.00 19.00	27.50 13.50	33.00 8.00	38.50 2.50	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
600	2.29 38.71	4.58 36.42	9.17 31.83	13.75 27.25	18.33 22.67	22.92 28.08	27.50 13.50	32.08 8.92	36.67 4.33	n/a	n/a	n/a	n/a
700	1.96 39.04	3.93 37.07	7.86 33.14	11.79 29.21	15.71 25.29	19.64 21.36	23.57 17.43	27.50 13.50	31.43 9.57	35.36 5.64	39.29 1.71	n/a	n/a
800	1.72 39.28	3.44 37.56	6.88 34.13	10.31 30.69	13.75 27.25	17.19 23.81	20.63 20.38	24.06 16.94	27.50 13.50	30.94 10.06	34.38 6.63	37.84 3.16	n/a
900	1.53 39.47	3.06 37.94	6.11 34.89	9.17 31.83	12.22 28.78	15.28 25.72	18.33 22.67	21.39 19.61	24.44 16.56	27.50 13.50	30.56 10.44	33.66 7.34	36.66 4.34
1000	1.38 39.63	2.75 38.25	5.50 35.50	8.25 32.75	11.00 30.00	13.75 27.25	16.50 24.50	19.25 21.75	22.00 19.00	24.75 16.25	27.50 13.50	30.25 10.75	33.00 8.00
1100	1.25 39.75	2.50 38.25	5.00 36.00	7.50 33.50	10.00 31.00	12.50 28.50	15.00 26.00	17.50 23.50	20.00 21.00	22.50 18.50	25.00 16.00	27.50 13.50	30.00 11.00
1200	1.15 39.85	2.29 38.71	4.58 36.42	6.88 34.13	9.17 31.83	11.46 29.54	13.75 27.25	16.04 24.96	18.33 22.67	20.63 20.38	22.92 18.08	25.19 15.81	27.50 13.50
1300	1.06 39.94	2.12 38.88	4.23 36.77	6.35 34.65	8.46 32.54	10.58 30.42	12.69 28.31	14.81 26.19	16.92 24.08	19.04 21.96	21.15 19.85	23.32 17.68	25.38 15.62
1400	0.98 40.02	1.96 39.04	3.93 37.07	5.89 35.11	7.86 33.14	9.82 31.18	11.79 29.21	13.75 27.25	15.71 25.29	17.68 23.32	19.64 21.36	21.56 19.44	23.58 17.42
1500	0.92 40.08	1.83 39.17	3.67 37.33	5.50 35.50	7.33 33.67	9.17 31.83	11.00 30.00	12.83 28.17	14.67 26.33	16.50 24.50	18.33 22.67	20.31 20.87	22.00 19.00

续上表

细胞浓度 (个/ μL)	细胞捕获量												
	500	1000	2000	3000	4000	5000	6000	7000	8000	9000	10000	11000	12000
1600	0.86 40.14	1.72 39.28	3.44 37.56	5.16 35.84	6.88 34.13	8.59 32.41	10.31 30.69	12.03 28.97	13.75 27.25	15.47 25.53	17.19 23.81	18.92 22.08	20.62 20.38
1700	0.81 40.19	1.62 39.38	3.24 37.76	4.85 36.15	6.47 34.53	8.09 32.91	9.71 31.29	11.32 29.68	12.94 28.06	14.56 26.44	16.18 24.82	17.82 23.18	19.42 21.58
1800	0.76 40.24	1.53 39.47	3.06 37.94	4.58 36.42	6.11 34.89	7.64 33.36	9.17 31.83	10.69 30.31	12.22 28.78	13.75 27.25	15.28 25.72	16.83 24.17	18.34 22.66
1900	0.72 40.28	1.45 39.55	2.89 38.11	4.34 36.66	5.79 35.21	7.24 33.76	8.68 32.32	10.13 30.87	11.58 29.42	13.03 27.97	14.47 26.53	15.95 25.05	17.36 23.64
2000	0.69 40.31	1.38 39.63	2.75 38.25	4.13 36.88	5.50 35.50	6.88 34.13	8.25 32.75	9.63 31.38	11.00 30.00	12.38 28.63	13.75 27.25	15.18 25.82	16.50 24.50

红色字体：细胞加样体积

蓝色字体：PBS缓冲液或1640培养基加入体积

灰色框：超过每个反应的最大细胞加样量

青色框：细胞转移体积过小可能造成细胞投入量的偏差

2.4 芯片准备和加样

2.4.1 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，将芯片倾斜贴在左侧支架末端，将芯片轻轻前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。

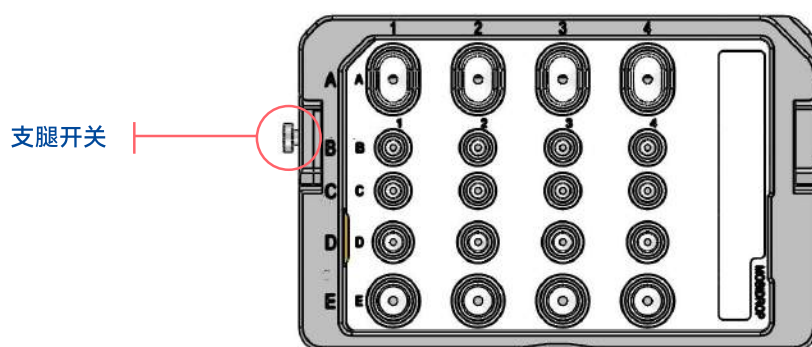


图 1: 芯片支架组装图



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，需用洁净的盖子遮盖芯片，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。

2.4.2 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。

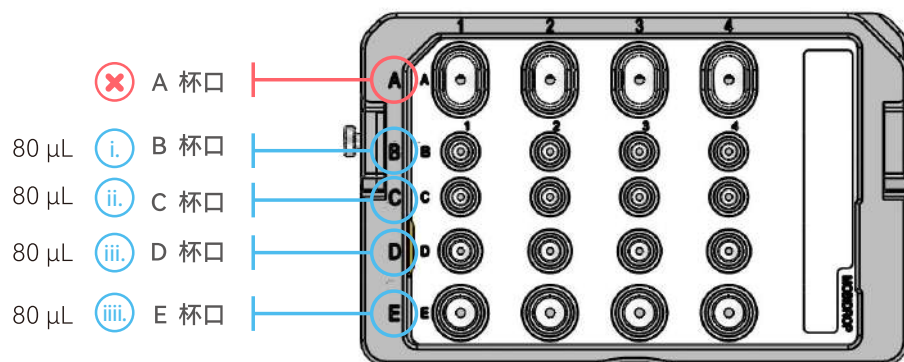


图 2: 芯片和支架展示

- 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杯口请勿加入其他任何试剂。

2.4.3 芯片加样

向各芯片杯口中加入对应的试剂, BCDE 分别对应: 3' 转录组微球、细胞相试剂、反转录试剂、液滴生成油。



注意:

- ① 使用不含镁离子、钙离子的 PBS 缓冲液重悬样品;
- ② 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;
- ③ 加样过程中应避免气泡产生。

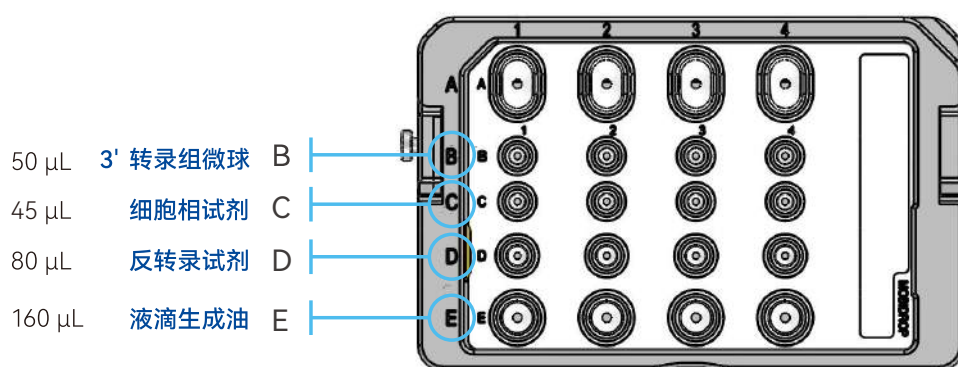


图 3: 芯片杯口展示图

- 提前 15 分钟取出 3' 转录组微球 v2.1 室温解冻, 使用涡旋混匀仪震动混匀 3' 转录组微球约 30 秒, 瞬时离心 10 秒, 静置 1 分钟;
- 缓慢吸出 50 μ L 3' 转录组微球 v2.1, 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。

- 将 45 μ L 细胞相试剂缓慢加入到标记为 C 的杯口中, 避免气泡产生;
- 将 80 μ L 反转录试剂缓慢加入到标记为 D 的杯口中, 避免气泡产生;
- 将 160 μ L 液滴生成油 v2.1 加入到标记为 E 的杯口中;
- 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。

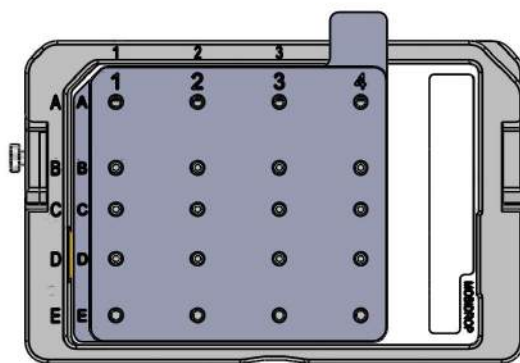


图 4: 加盖垫片

2.5 MobiNova®-100 运行

**警告:**

确保仪器开机预热 10 分钟后再使用。

- 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。



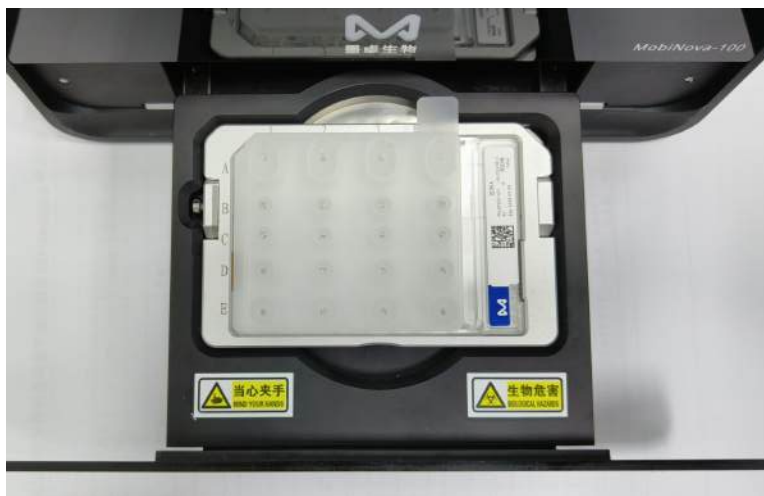


图 6: 放置芯片展示

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

2.6 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。

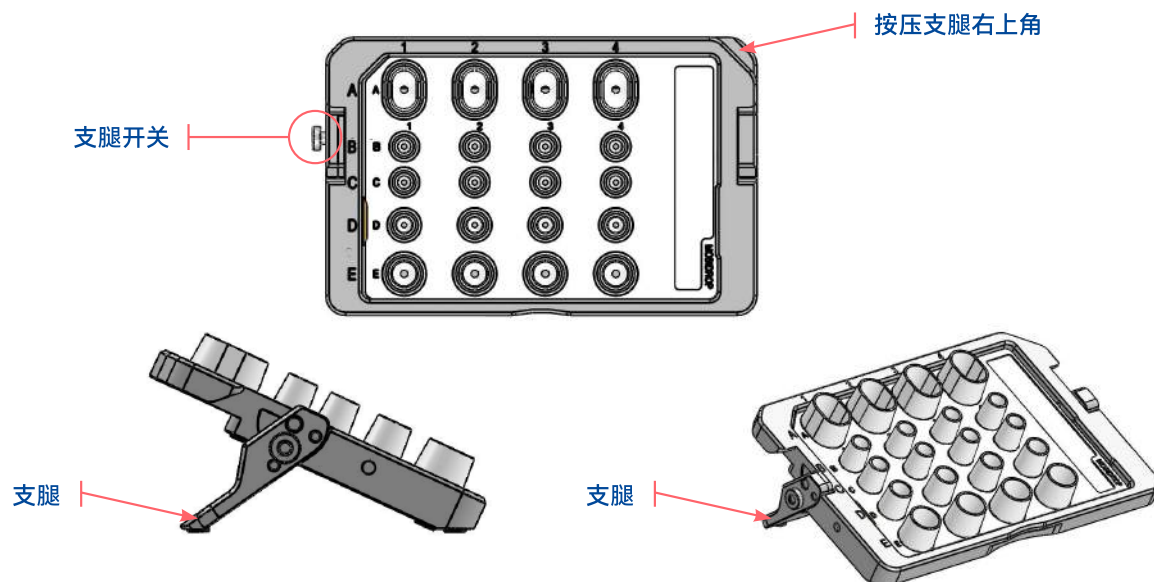


图 12: 开启芯片支架

- b. 准备 1.5 mL 低吸附离心管, 使用 200 μ L 广口低吸附枪头, 将量程调至 85 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, 不丢弃枪头;



警告:

转移液滴时使用广口枪头操作。



图 13: 转移底油图

c. 将量程调至 150 μL , 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), 直至液滴全部转移完毕。



图 14: 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 离心管管壁的液面部分, 避免手上静电导致液滴破碎。

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, 芯片支架回到水平放置状态。

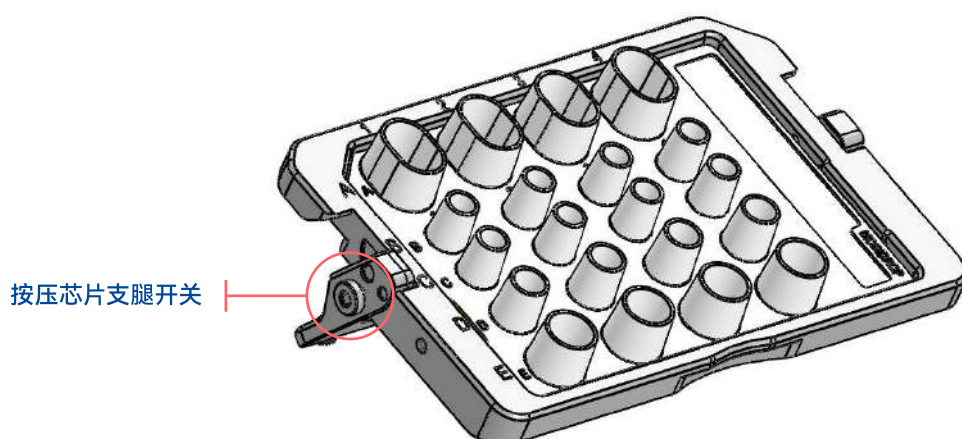


图 15: 芯片取出及支架恢复

2.7 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;

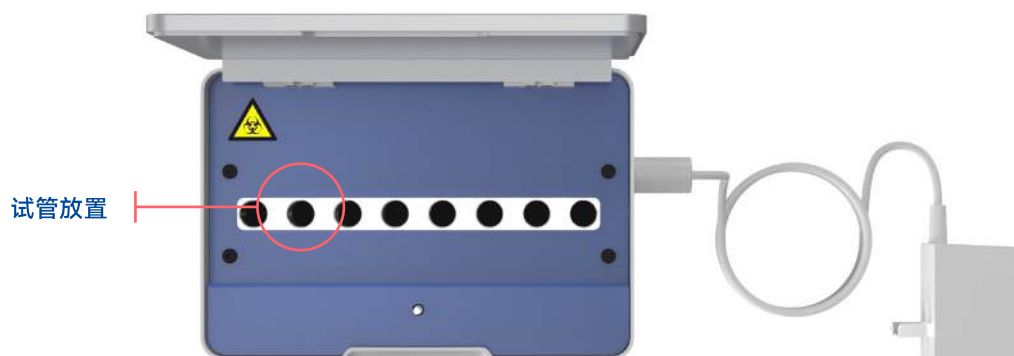


图 16: 液滴预处理器开盖图

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 17: 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**液滴反转录**步骤。

2.8 液滴反转录

- a. 一个样本准备 2 个 0.2 mL PCR 管;
- b. 调节 200 μ L 移液枪量程至 85 μ L, 使用广口低吸附枪头将底部透明底油尽量吸除干净;



警告:

- ① 转移液滴时使用广口低吸附枪头操作。
- ② 避免用手接触收集液滴的 1.5 mL 离心管管壁的液面部分, 避免手上静电导致液滴破碎。

- c. 不更换枪头, 调节量程至 70 μ L, 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;



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。

- d. 将 0.2 mL PCR 管平稳转移到 PCR 仪上, 按照以下程序, 进行反转录 (耗时约 1 小时 5 分钟)

热 盖	反应体系	运行时间
90°C	100 μ L	~65 min
步骤	温度	时间
1	50°C	60 min
2	85°C	5 min
3	8°C	∞



停止点:

在 4°C 条件下可保存 48 小时; 在 -20°C 或 -80°C 条件下可保存 1 周; 或继续进行下一步实验。

3. 反转录后样品处理和 cDNA 扩增

3.1 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 v2.1	室温	—
	5×重悬缓冲液 v2.1	-20°C	配制成1×重悬缓冲液, 备用
cDNA预扩增试剂准备		存储温度	注意事项
预扩增反应试剂	2×预扩增混合液 v2.1	-20°C	冰上解冻
	预扩增引物 v2.1	-20°C	冰上解冻
回收滤芯准备		存储温度	注意事项
回收滤芯	滤芯 v2.1	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反转录的纯化产物
1× 重悬缓冲液	室温	用于转移液滴后 0.2 mL PCR管的清洗
DNA Elution Buffer	室温	用于重悬预扩增的纯化产物
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	新鲜配制, 用于扩增产物的纯化
Qubit™ 1× dsDNA 试剂盒	4°C	用于纯化产物的DNA定量

**提示:**

步骤 3.2 — 步骤 3.6 最好于超净工作台中或清理台面后操作。

3.2 破乳

- 如果含反转录产物的 0.2 mL PCR 管保存在 -20°C 或 -80°C , 提前取出 0.2 mL PCR 管, 置于 4°C 解冻;
- 待反转录产物完全解冻后, 瞬时离心 10 秒;
- 将 2 个 0.2 mL PCR 样本管中的乳浊液转移至同一滤芯上 (如下图 18 破乳前), 并加入 100 μL 回收剂 v2.1, 静置 2 分钟;

**注意:**

转移液滴后, 需要加入回收剂, 不可直接离心。

- 轻微晃动滤芯管体, 瞬时离心 10 秒。

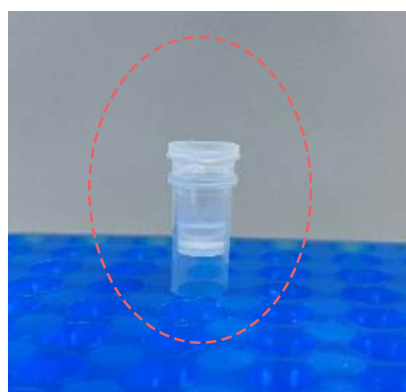
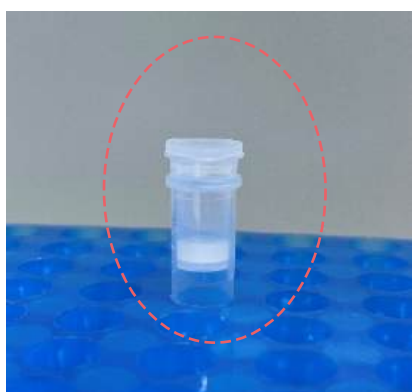


图 18: 破乳前后对比

3.3 过滤及清洗

- 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。
- 按照下表稀释反转录试剂盒内 5 \times 重悬缓冲液 v2.1:

重悬缓冲液试剂	1.1 \times 体积 (μL)	终浓度
NF-H ₂ O	88	-
5 \times 重悬缓冲液 v2.1	22	1 \times
总计	110	



- c. 在离心完成后的滤芯中加入 100 μL 1 \times 重悬缓冲液, 将 200 μL 的移液枪量程调节至 80 μL , 吹打滤芯内液体 10 次;



提示:

1. 避免移液枪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, 可转动抓取外管管口外沿或管身。

- d. 将 c 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, 若残留液体过多, 请立即更换滤芯可以再增加 1-2 次离心过滤干净液体。

- e. 丢弃滤芯滤膜, 使用滤芯收集管内液体用于反转录产物纯化。



提示:

破乳离心时正常离心次数是 2 次。如果离心两次后液体仍过滤不下去, 需要立即更换滤芯, 更换滤芯后可以再增加 1-2 次离心, 彻底过滤干净液体, 总离心次数不宜超过 4 次。

3.4 反转录产物纯化

- a. 将 SPRIselect beads 涡旋震动充分混匀;
- b. 将 200 μL 的移液枪量程调节至 115 μL , 并沿滤芯管壁插入底部, 取出底部油相并丢弃, 收集管内水相体积约 190 μL - 210 μL 。
- c. 向收集管内加入 240 μL (1.2 \times) SPRIselect beads, 置于涡旋混匀仪上轻轻震动混匀;



提示:

若 3.3 过程样品体积损失过多, 需测量 3.3 中过滤后的样品体积, 并按样品体积的加入 1.2 \times 的 SPRIselect beads, 置于涡旋混匀仪上轻轻震动混匀。

- d. 室温孵育 5 分钟;
- e. 瞬时离心收集管, 置于 1.5 mL 磁力架上静置 5 分钟;
- f. 弃除上清液, 避免吸取到磁珠;
- g. 将收集管静置于磁力架上, 加入 1000 μL 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;

- h. 重复步骤 g 两次;
- i. 将收集管瞬时离心 (有磁珠一面朝外), 放置在磁力架上, 静置 30 秒;
- j. 用 20 μL 移液枪去除管内剩余的 80%乙醇, 可反复多次, 至无明显液体残留;
- k. 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;
- l. 从磁力架上取下收集管, 立即加入 48 μL NF- H_2O ;
- m. 将 200 μL 的移液枪量程调节至 40 μL , 吹打 15 次, 将磁珠与液体完全混匀;
- n. 室温孵育 3 分钟;
- o. 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);
- p. 转移 46 μL 洗脱液至新 0.2 mL PCR 管中, 并放置于冰上;

**提示:**

总计 46 μL 洗脱液于 0.2 mL PCR 管作为预扩增的模板。

3.5 预扩增

- a. 按照下表在冰上配制预扩增反应试剂:

预扩增反应试剂	1 \times (μL)	2.2 \times (μL)	3.3 \times (μL)	4.4 \times (μL)
2 \times 预扩增混合液 v2.1	50	110	165	220
预扩增引物 v2.1	4	8.8	13.2	17.6
合 计	54	118.8	178.2	237.6

- b. 在冰上加入 54 μL 预扩增反应试剂于 46 μL 样品中, 将 200 μL 的移液枪量程调节至 90 μL , 吹打 15 次混匀;



c. 按照下述 PCR 程序进行扩增:

热 盖	反应体系	运行时间
105°C	100 μ L	~90 min
步骤	温度	时间
1	98°C	3 min
2	98°C	20 s
3	67°C	15 s
	72°C	4 min

步骤 2-4 循环数: 见下表

5	72°C	5 min
6	8°C	∞

细胞投入量	循环数
5000-10000	14
10000-20000	12
20000-30000	11



停止点:

在 4°C 条件下可保存 72 小时或继续进行下一步实验。

3.6 预扩增产物纯化

- 将 SPRIselect beads 涡旋震动充分混匀;
- 在含 cDNA 预扩增产物的 PCR 管中加入 60 μ L (0.6 \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, PCR 管置于 0.2 mL 磁力架上静置 5 分钟, 直至溶液变澄清;
- 弃上清, 避免吸取到磁珠;

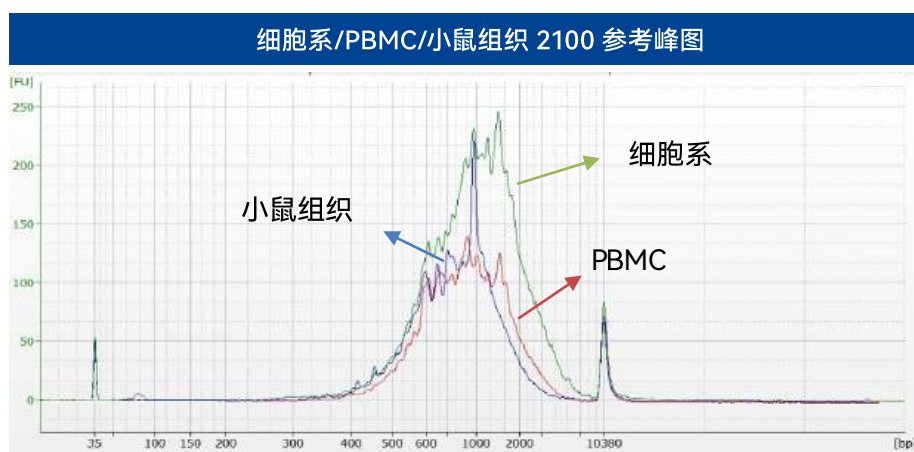
- f. 将PCR管静置于磁力架上, 加入 200 μ L 新鲜配制的 80% 乙醇 (沿磁珠的对壁加入, 切勿碰到磁珠), 静置 30 秒;
- g. 弃上清, 重复步骤 f 一次;
- h. 弃上清, 瞬时离心 (有磁珠一面朝外), PCR管放置于磁力架上, 静置 10 秒;
- i. 用 20 μ L 移液枪去除管内剩余 80% 乙醇, 可反复多次, 至无明显液体残留;
- j. 打开PCR管盖晾干磁珠 (约 3-5 分钟), 直至磁珠表面无水光反射, 同时避免过度干燥导致磁珠开裂;
- k. 从磁力架上取下PCR管, 立即加入 25 μ L DNA Elution Buffer;
- l. 将20 μ L的移液枪量程调节至 18 μ L, 吹打 15 次, 直至磁珠与液体完全混匀;
- m. 室温孵育 3 分钟;
- n. 瞬时离心, 将PCR管放回至磁力架静置, 直至溶液变澄清 (约 3 分钟);
- o. 转移 23 μ L 洗脱液至新 0.2 mL PCR 管。

**停止点:**

在 4°C 条件下可保存 72 小时; 在 -20°C 条件下可保存 4 周; 或继续进行下一步实验。

3.7 cDNA 质检

- a. 取 1 μ L cDNA纯化后的样品进行 Qubit 浓度测定;
- b. 取 1 μ L cDNA纯化后的样品进行安捷伦 2100 HS DNA 质检分析。



4. 文库构建

4.1 试剂准备

单细胞文库构建试剂准备		存储温度	注意事项
片段化试剂	● 片段化缓冲液 v2.1	-20°C	冰上解冻
	● 片段化酶 v2.1	-20°C	冰上放置
连接反应试剂及 连接产物纯化	● 连接缓冲液 v2.1	-20°C	冰上解冻
	● 连接酶 v2.1	-20°C	冰上放置
	● 接头 v2.1	-20°C	冰上解冻, 配置成接头工作液
建库PCR试剂	○ 扩增混合液 v2.1	-20°C	冰上解冻
	3' dual index-X	-20°C	冰上解冻, 记录X-N使用编号

■ 按照下表提前准备试剂:

试剂	温度	用途
NF-H ₂ O	室温	用于重悬连接后的纯化产物
DNA Elution Buffer	室温	用于接头稀释和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

4.2 cDNA 片段化

- a. 确保片段化缓冲液 v2.1 完全解冻, 涡旋振荡混匀片段化酶 v2.1 和片段化缓冲液 v2.1 5-8 秒, 瞬时离心后放置于冰盒上;
- b. 每个样本 cDNA 按照下表取样量进行片段化反应, 剩余 cDNA 可置于 -20°C 保存。样本进行片段化反应时总体积需满足 35 μL , 若按下表投入的样本体积不足 35 μL 时, 则补充 NF- H_2O 至总体积为 35 μL ;

cDNA 浓度 (ng/ μL)	投入量
0.5-5 ng / μL	10 μL
5-10 ng / μL	50 ng
10-30 ng / μL	100 ng
30 ng / μL 以上	3 μL

- c. 按下表在冰上配制片段化试剂, 充分涡旋混匀:

片段化试剂	1 \times (μL)	2.2 \times (μL)	3.3 \times (μL)	4.4 \times (μL)
片段化缓冲液 v2.1	5	11	16.5	22
片段化酶 v2.1	10	22	33	44
合计	15	33	49.5	66

- d. 在冰上向每个样品管中加入 15 μL 片段化试剂, 将 100 μL 的移液枪量程调节至 40 μL , 缓慢吹打混匀并瞬时离心;
- e. 提前在 PCR 仪中设置以下程序, 样品放入 PCR 仪后, 立即跳过 4°C 预冷步骤:

热 盖	反应体系	运行时间
75°C	50 μL	~39 min
步骤	温度	时间
1	4°C	∞
2	32°C	8 min
3	65°C	30 min
4	8°C	∞

- f. 反应结束后, 立即取出样品管置于冰上, 进行下一步接头连接反应。

4.3 片段化产物接头连接

a. 按照下表在冰上提前配制连接反应试剂, 使用前, 用移液枪吹打混匀连接缓冲液 15 次, 用手指轻弹颠倒混匀连接酶 5 次;

连接反应试剂	1× (μL)	2.2× (μL)	3.3× (μL)	4.4× (μL)
连接缓冲液 v2.1	20	44	66	88
连接酶 v2.1	10	22	33	44
NF.H ₂ O	16	35.2	52.8	70.4
合计	46	101.2	151.8	202.4

b. 在冰上向每个样品管中加入 46 μL 的连接反应试剂, 振荡混匀后, 瞬时离心;

c. 加入 4 μL 的接头 v2.1;

d. 用量程为 100 μL 的移液枪调节至 90 μL, 吹打样品管内液体 15 次, 充分混匀, 瞬时离心;

e. 在 PCR 仪中进行以下程序:

热 盖	反应体系	运行时间
关闭	100 μL	~15 min
步骤	温度	时间
1	20°C	15 min
2	4°C	∞

f. 反应结束后, 立即进行下一步连接产物分选。



提示:

PCR仪设置为热盖功能关闭, 无该功能的PCR仪可设置 30°C 热盖温度。

4.4 连接产物分选

- 提前将 SPRIselect beads 涡旋震动充分混匀;
- 向含有连接产物的PCR管中加入 40 μL NF-H₂O;
- 向含有连接产物的PCR管再加入 42 μL (0.3 \times) SPRIselect beads, 涡旋震动混匀 10 下;
- 室温孵育 5 分钟;
- 瞬时离心, 置于 0.2 mL 磁力架上静置 5 分钟, 直至溶液变澄清;
- 将移液枪调节至 175 μL 量程, 转移上清液至新 0.2 mL PCR 管中, 弃磁珠;



注意:

此步转移上清液, 切勿丢弃!

- 向 f 中的PCR管中加入 42 μL (0.3 \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 新鲜配制的 80% 乙醇 (沿磁立架对壁加入, 避免碰到磁珠), 静置 30 秒;
- 弃上清液, 重复步骤k一次;
- 弃上清, 瞬时离心 (有磁珠一面朝外), 放置于磁力架上, 静置 10 秒
- 用 20 μL 移液枪去除剩余 80% 乙醇, 可反复多次, 至无明显液体残留;
- 打开样品管盖晾干磁珠 (约 2 - 3 分钟), 直至磁珠表面无水光反射, 同时避免过度干燥使磁珠开裂;
- 立即从磁力架取下样品管, 向每个样品管中加入 22 μL NF-H₂O;
- 将 20 μL 的移液枪量程调节至 15 μL , 吹打 15 次, 直至磁珠完全混匀于液体中;
- 室温孵育 3 分钟;
- 瞬时离心, 将样品管放回至磁力架静置, 直至溶液变澄清;
- 转移 20 μL 洗脱液至新 0.2 mL PCR管, 并放置于冰上。



4.5 文库标签扩增

- 在冰上向含有纯化连接产物 (20 μL) 的样品管中加入 25 μL 扩增混合液 v2.1;
- 向上一部的 45 μL 反应体系中加入 5 μL 3' dual Index;
- 将移液枪调节至 45 μL , 吹打混匀 15 次 (缓慢吹打, 避免气泡);



注意:

记录每个样品的 3' dual Index 编号, 避免交叉污染。

- 进行 PCR 扩增, 程序如下:

热 盖	反应体系	运行时间
105°C	50 μL	~40 min
步骤	温度	时间
1	98°C	2 min
2	98°C	20 s
3	65°C	30 s
4	72°C	30 s



步骤 2-4 为循环, 循环数参考下表

5	72°C	1 min
6	8°C	∞

输入 cDNA 量	循环数
0.25 - 10 ng	13-16
10 - 20 ng	12-13
20 - 50 ng	11-12
50 - 100 ng	10-11
100 - 200 ng	9-10



停止点:

在 4°C 下可保存 72 小时, 或继续下一步实验。

4.6 文库片段分选

- a. 提前将 SPRIselect beads 涡旋震动充分混匀;
- b. 向文库扩增产物的PCR管中加入 50 μ L DNA Elution Buffer, 用移液器吹打混匀;
- c. 向文库扩增产物的PCR管中再加入 50 μ L (0.5 \times) SPRIselect beads, 涡旋震动混匀 10 下;
- d. 室温孵育 5 分钟;
- e. 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);
- f. 将移液枪量程调节至 145 μ L, 转移上清液至新 0.2 mL PCR 管中, 弃磁珠;



注意:

此步转移上清液, 切勿丢弃!

- g. 向 f 中的PCR管中再加入 25 μ L (0.25 \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 μ L 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;
- l. 重复步骤 k 一次;
- m. 瞬时离心 (有磁珠一面朝外), PCR管放置于磁力架上, 静置 10 秒;
- n. 用 20 μ L 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;
- o. 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;
- p. 立即从磁力架取下PCR管, PCR管内加入 22 μ L DNA Elution Buffer;
- q. 将 20 μ L 移液枪量程调至 20 μ L, 吹打混匀 15 次, 直至磁珠完全在液体中混匀;
- r. 室温孵育 3 分钟;
- s. 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);
- t. 转移 20 μ L 洗脱液至新 0.2 mL PCR 管或1.5 mL 离心管。



停止点:

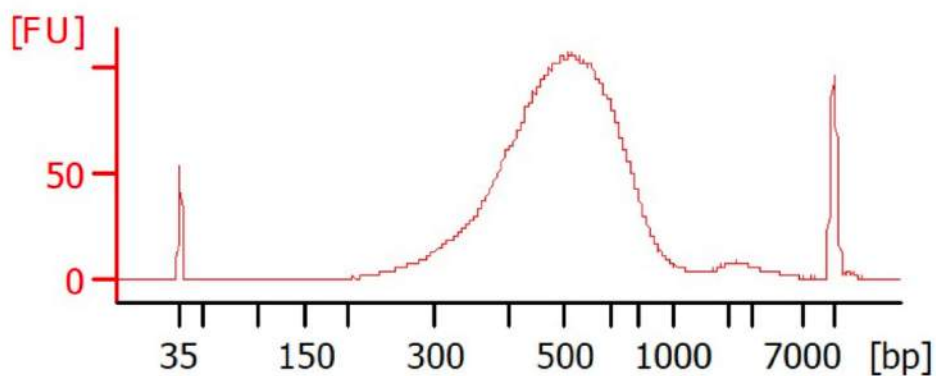
在 4°C 条件下可保存 72 小时或在 -20°C 条件下长期储存。



4.7 文库质检





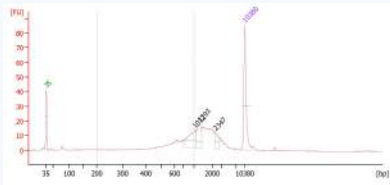
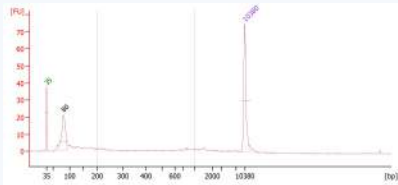
- 取 1 μL 文库纯化产物进行 Qubit 浓度测定;
- 取 1 μL 样品, 可根据 a 中测定浓度稀释样品, 进行安捷伦 2100 HS DNA 质检分析;

文库 2100 参考峰图

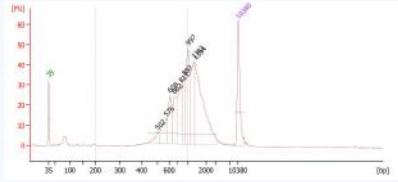
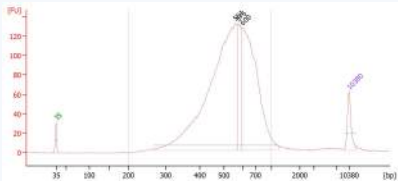
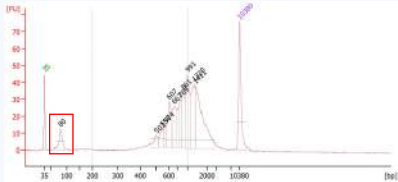
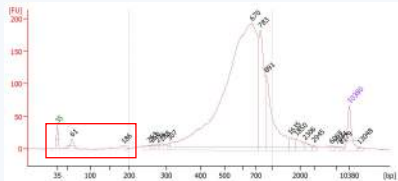


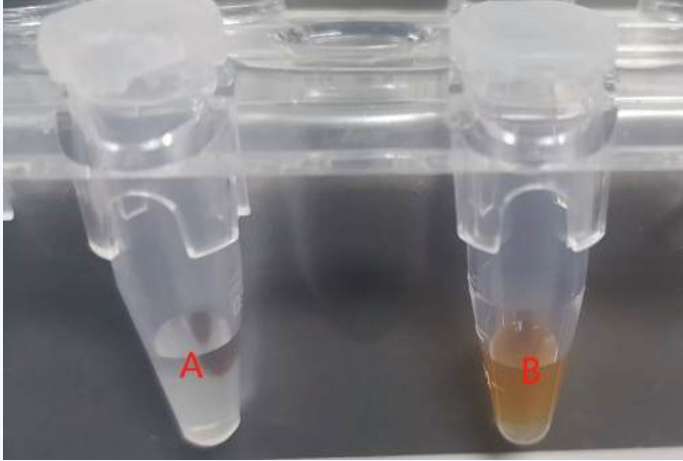
- 选择合格文库进行下一步测序, 测序平台推荐 NovaSeq S4, 测序类型选择 PE150。

Troubleshooting

问题描述	正常状态描述	异常状态描述
a. 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:	<p>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 μm 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 3' 转录组反转录试剂盒LN编号, 反馈给 support@mobidrop.com 邮箱后等待技术支持联系您。</p>	
b. 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cDNA回收量降低</p>
异常处理方法:	<p>按照 3.3 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 μL, 即可进行后续实验</p>	
c. 细胞投入量低时, cDNA质控状态	<p>1 ng/μL < cDNA浓度 < 10 ng/μL, cDNA有明显的主峰, 无引物二聚体</p> <p>cDNA峰图:</p> 	<p>1 ng/μL < cDNA浓度 < 10 ng/μL, cDNA有明显的主峰, 无引物二聚体</p> <p>cDNA峰图:</p>  <p>影响: 无法满足建库要求</p>

问题描述	正常状态描述	异常状态描述																					
异常处理方法:	对cDNA纯化产物再次进行cDNA预扩增及纯化, cDNA预扩增循环数为 5 , 具体步骤如下: a. 取 23 μL 第一轮cDNA预扩增纯化后的产物作为模板, 加入到PCR管内 b. 按照如下反应体系配制cDNA预扩增反应液:																						
	<table><tr><th>预扩增反应试剂</th><th>1× 试剂加入量 (μL)</th></tr><tr><td>2×预扩增混合液 v2.1</td><td>25</td></tr><tr><td>预扩增引物 v2.1</td><td>2</td></tr><tr><td>合计</td><td>27</td></tr></table>	预扩增反应试剂	1× 试剂加入量 (μL)	2×预扩增混合液 v2.1	25	预扩增引物 v2.1	2	合计	27														
	预扩增反应试剂	1× 试剂加入量 (μL)																					
	2×预扩增混合液 v2.1	25																					
	预扩增引物 v2.1	2																					
	合计	27																					
	<table><tr><th>热 盖</th><th>反应体系</th><th>运行时间</th></tr><tr><td>105℃</td><td>50 μL</td><td>~40 min</td></tr><tr><td>步骤</td><td>温度</td><td>时间</td></tr><tr><td>1</td><td>98℃</td><td>3 min</td></tr><tr><td rowspan="4">2</td><td>98℃</td><td>20 s</td></tr><tr><td>67℃</td><td>15 s</td></tr><tr><td>72℃</td><td>4 min</td></tr><tr><td>8℃</td><td>∞</td></tr></table>	热 盖	反应体系	运行时间	105℃	50 μL	~40 min	步骤	温度	时间	1	98℃	3 min	2	98℃	20 s	67℃	15 s	72℃	4 min	8℃	∞	
	热 盖	反应体系	运行时间																				
	105℃	50 μL	~40 min																				
	步骤	温度	时间																				
1	98℃	3 min																					
2	98℃	20 s																					
	67℃	15 s																					
	72℃	4 min																					
	8℃	∞																					
c. 扩增完成后, 按照3.6 预扩增产物纯化的标准操作步骤进行。																							
d. 纯化完成后, cDNA浓度应 > 0.1 ng/μL, 该步骤cDNA参考峰图:																							
																							
可进行后续文库构建步骤。																							
e. 若cDNA峰图仍然无明显主峰, 说明该样本制备失败, 建议优化细胞状态, 并提高细胞投入量重新上机。																							

问题描述	正常状态描述	异常状态描述
d. 常规cDNA文库和测序文库峰图	<p>文库有明显主峰, 无引物二聚体或接头污染</p> <p>cDNA文库:</p>  <p>测序文库:</p> 	<p>文库有明显主峰, 但有明显的引物二聚体或接头污染</p> <p>cDNA文库:</p>  <p>测序文库:</p>  <p>影响:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1.cDNA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。</p> <p>二次纯化具体步骤如下:</p> <ol style="list-style-type: none"> a. 向cDNA纯化产物中加入 DNA Elution Buffer 至总体积为 50 μL; b. 涡旋震动充分混匀 SPRIselect beads; c. 将 40 μL (0.8\times) SPRIselect beads加入到cDNA纯化产物的1.5 mL离心管中, 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 1.5 mL 磁力架上静置 5 分钟, 直至溶液变澄清 (约 3 分钟); f. 弃上清 (避免吸取到磁珠); g. 将离心管静置于磁力架上, 加入 200 μL 新鲜配制的 80% 乙醇, 静置 30 秒; h. 弃上清, 重复步骤 g 一次; i. 弃上清, 瞬时离心, 离心管放置在磁力架上, 静置 10 秒; j. 用 20 μL 移液枪去除管内剩余的 80% 乙醇, 可反复多次, 至无明显液体残留; k. 打开离心管盖晾干磁珠 (约 2-4 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; l. 从磁力架上取下离心管, 立即向离心管内加入 22 μL DNA Elution Buffer; m. 用移液枪吹打 15 次, 直至磁珠在液体中完全混匀; n. 室温孵育 3 分钟; o. 瞬时离心, 将离心管放回磁力架上静置, 直至溶液变清 (约 3 分钟); p. 转移 20 μL 洗脱液至新 1.5 mL 离心管。 	

问题描述	正常状态描述	异常状态描述
异常处理方法:	<div></div> <div><p>1.使用SPRI之前注意多混匀一下, 可延长涡旋时间, 确保充分混匀;</p><p>2.加磁珠至对应DNA溶液中, 注意加到溶液中段, 不要太上和太下;</p><p>3.如果出现图示现象, A为吸附干净的正常情况, B为吸附不干净的异常情况, 如若出现B的异常情况, 则在磁力架上用枪吹打混匀, 再静置 1 分钟。</p></div>	

附录

MobiCube 3' Dual Index 套装

	1	2	3	4	5	6	7	8
3' Dual Index-A	N701	N702	N703	N704	N705	N706	N707	N708
	S501	S502	S503	S504	S505	S506	S507	S508
3' Dual Index-B	N702	N703	N704	N705	N706	N707	N708	N709
	S503	S504	S505	S506	S507	S508	S501	S502
3' Dual Index-C	N703	N704	N705	N706	N707	N708	N709	N710
	S505	S506	S507	S508	S501	S502	S503	S504
3' Dual Index-D	N704	N705	N706	N707	N708	N709	N710	N711
	S507	S508	S501	S502	S503	S504	S505	S506
3' Dual Index-E	N705	N706	N707	N708	N709	N710	N711	N712
	S501	S502	S503	S504	S505	S506	S507	S508
3' Dual Index-F	N706	N707	N708	N709	N710	N711	N712	N701
	S503	S504	S505	S506	S507	S508	S501	S502
3' Dual Index-G	N707	N708	N709	N710	N711	N712	N701	N702
	S505	S506	S507	S508	S501	S502	S503	S504
3' Dual Index-H	N708	N709	N710	N711	N712	N701	N702	N703
	S507	S508	S501	S502	S503	S504	S505	S506
3' Dual Index-I	N709	N710	N711	N712	N701	N702	N703	N704
	S501	S502	S503	S504	S505	S506	S507	S508
3' Dual Index-J	N710	N711	N712	N701	N702	N703	N704	N705
	S503	S504	S505	S506	S507	S508	S501	S502
3' Dual Index-K	N711	N712	N701	N702	N703	N704	N705	N706
	S505	S506	S507	S508	S501	S502	S503	S504
3' Dual Index-L	N712	N701	N702	N703	N704	N705	N706	N707
	S507	S508	S501	S502	S503	S504	S505	S506

	Index编号	Index
i5	S501	GCGATCTA
	S502	ATAGAGAG
	S503	AGAGGATA
	S504	TCTACTCT
	S505	CTCCTTAC
	S506	TATGCAGT
	S507	TACTCCTT
	S508	AGGCTTAG
i7	N701	TAAGGCGA
	N702	CGTACTAG
	N703	AGGCAGAA
	N704	TCCTGAGC
	N705	GGACTCCT
	N706	TAGGCATG
	N707	CTCTCTAC
	N708	CAGAGAGG
	N709	GCTACGCT
	N710	CGAGGCTG
	N711	AAGAGGCA
	N712	GTAGAGGA

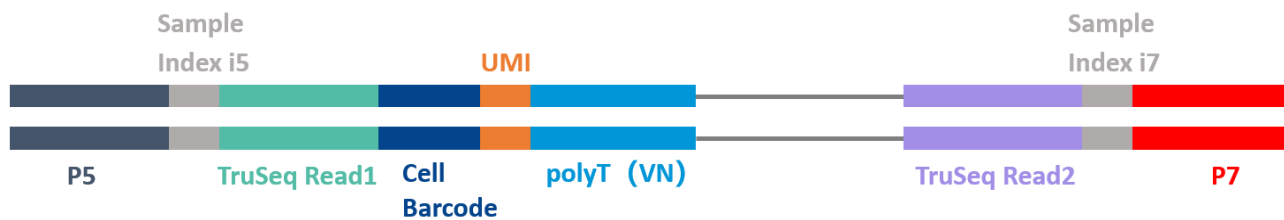
注:

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。

cDNA合成和测序文库原理示意图:



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，并不得以任何形式转播。

MOBIDROP