

单细胞测序实验操作指南

Vazyme 您身边的建库专家

南京诺唯赞生物科技有限公司
Nanjing Vazyme Biotech Co.,Ltd.

www.vazyme.com



南京诺唯赞生物科技有限公司 (Vazyme Biotech Co.,Ltd) 致力于酶和抗体的研发和生产，产品涵盖体外诊断、高通量测序和生命科学研究等领域。公司坐落于六朝古都南京，背靠风景秀丽的栖霞山，依托国家级南京经济技术开发区的区域辐射力，以先进的研发能力和领先的技术力量，书写全新的民族生物科技格局。

InnoVation in Enzyme Technology



Vazyme 订购指南

◆ 销售渠道

南京总部

地址：江苏省南京经济技术开发区科创路红枫科技园 C2 栋

电话：400-600-9335

邮箱：sales@vazyme.com

北京办事处

地址：北京市昌平区北清路 1 号院珠江摩尔大厦 6 号楼 1 单元 812 室

电话：17372772080

邮箱：caoxiaobiao@vazyme.com

上海办事处

地址：上海市浦东新区创新西路 76 号 44 栋

电话：021-50703332

邮箱：sales_sh@vazyme.com

广州办事处

地址：广东省广州市天河区车陂路 330 号 M1501 室

电话：15920598727

邮箱：laidongmei@vazyme.com

杭州办事处

地址：浙江省杭州市西湖区古墩路 673 号瑞博国际 A 座 906

电话：13381348270

邮箱：guxiaolu@vazyme.com

南京办事处

地址：江苏省南京市秦淮区大行宫日月大厦 2804

电话：15850550176

邮箱：wangdan@vazyme.com

武汉办事处

地址：湖北省武汉市洪山区珞喻路 1 号鹏程国际 A 座 1517 室

电话：15850796526

邮箱：liuchangkun@vazyme.com

福建办事处

地址：福建省福州市仓山区闽江大道 20 号中联水岸名居 1#1003

电话：18850755845

邮箱：linyuxiang@vazyme.com

山东办事处

地址：山东省济南市华能路 138 号 3 号楼 6 单元 902 室

电话：17372772182

邮箱：wangdandan@vazyme.com

扬州办事处

地址：江苏省扬州市维扬区东方百合园 33 栋 501

电话：18652408582

邮箱：songqin@vazyme.com

苏州办事处

地址：江苏省苏州市工业园区莲花新村五区 113 栋

电话：18115486826

邮箱：liudeli@vazyme.com

代理商渠道

地址：江苏省南京经济技术开发区科创路红枫科技园 C2 栋

电话：18112951766

邮箱：xiaoyunxiao@vazyme.com

海外事业部

Mobile: +86-18616767852

Email: wangdong@vazyme.com

Vazyme 您身边的建库专家

◆ NGS 文库系列产品

DNA-seq

VAHTS™ Universal DNA Library Prep Kit for Illumina V3 (ND607)	传统快速流程 DNA 文库构建
TruePrep™ DNA Library Prep Kit V2 for Illumina (TD501/502/503)	转座酶超快速 DNA 文库构建
VAHTS™ AmpSeq Library Prep Kit V2 (NA201)	多重靶向扩增子文库构建 (修饰引物)
VAHTS™ AmpSeq General Library Prep Kit V2 (NA203)	多重靶向扩增子文库构建 (非修饰引物)
VAHTS™ AmpSeq Cancer HotSpot Panel (NA102)	癌症热点 panel (50 个热点癌基因位点)
VAHTS™ Mate Pair Library Prep Kit for Illumina (ND104)	Mate Pair 文库构建 (De novo 测序)

RNA-seq

VAHTS™ mRNA-seq V3 Library Prep Kit for Illumina (NR611)	常规 mRNA 文库构建
VAHTS™ Stranded mRNA-seq Library Prep Kit for Illumina V2 (NR612)	链特异性 mRNA 文库构建
VAHTS™ Total RNA-seq (H/M/R) Library Prep Kit for Illumina (NR603)	探针法去除 rRNA 全转录组文库构建
VAHTS™ Small RNA Library Prep Kit for Illumina (NR801)	小 RNA 文库构建

单细胞扩增

Discover-sc® Single Cell Kit (N601)	单细胞基因组 / 微量 DNA 扩增试剂盒
Discover-sc® Single Cell Kit V2 (N602)	单细胞基因组 / 微量 DNA 扩增试剂盒 (含人基因组检测模块)
Discover-sc® WTA Kit V2 (N711)	单细胞转录组 / 微量 RNA 扩增试剂盒

分离与检测

VAHTS™ DNA Clean Beads (N411)	DNA 纯化分选磁珠
VAHTS™ RNA Clean Beads (N412)	RNA 纯化磁珠
VAHTS™ Library Quantification Kit for Illumina (NQ101-106)	文库 qPCR 绝对定量
VAHTS™ Human Genomic DNA Quantification and QC Kit (NQ201)	人基因组 DNA 质量评价试剂盒
Equalbit™ dsDNA HS Assay Kit (EQ111)	Qubit DNA 高敏检测试剂
Equalbit™ RNA HS Assay Kit (EQ211)	Qubit RNA 高敏检测试剂
Equalbit™ RNA BR Assay Kit (EQ212)	Qubit RNA 宽泛检测试剂
VAHTS™ Blood Collection Tube for cell-free DNA Preservation (N901)	游离 DNA 保存管
VAHTS™ Serum/Plasma Circulating DNA Kit (N902)	游离 DNA 提取试剂

模块与单酶原料

VAHTS™ Universal End preparation Module for Illumina (N203)	DNA 末端修复及加 A 模块
VAHTS™ Universal Adapter Ligation Module for Illumina (N204)	接头连接模块
VAHTS™ HiFi Amplification Mix (N616)	文库扩增模块
VAHTS™ mRNA Capture Beads (N401)	mRNA 抓取磁珠
VAHTS™ 2 × Frag/Prime Buffer (N402)	RNA 打断 buffer
Ribo-off™ rRNA Depletion Kit (Human/Mouse/Rat) (N406)	真核 rRNA 去除模块 (探针)
Ribo-off™ rRNA Depletion Kit (Bacteria) (N407)	原核 rRNA 去除模块 (探针)
Phanta® Uc Super-Fidelity DNA Polymerase for Library Amplification (P507)	耐 U 高保真 DNA 聚合酶
T4 DNA polymerase (N101)	T4 DNA 聚合酶
T4 Polynucleotide Kinase (N102)	T4 多聚核苷酸激酶
T4 DNA ligase (Rapid) (N103)	T4 DNA 连接酶
DNA polymerase I Klenow fragment (N104)	DNA 聚合酶 I (Klenow) 大片段
DNA polymerase I Klenow fragment exo- (N105)	Klenow 片段 (3'-5' exo-)
Phi29 MAX DNA Polymerase (N106)	Phi29 DNA 聚合酶



学霸就要自己建库

Vazyme 实验指南，带你玩转 NGS！

目录

01 测序背景知识	8
二代测序发展简史	8
Illumina 测序简介	9
文库的基本结构	9
测序芯片结构	9
Illumina 测序过程	10
文库质控	11
常规文库测序参数	12
02 单细胞测序	13
单细胞测序概述	13
单细胞测序基本流程概要	13
单细胞分离	14
单细胞分离前注意事项	14
目的细胞富集	14
分离方法	15
单细胞扩增	16
单细胞转录组扩增	16
单细胞转录组测序技术难点	16
单细胞转录组扩增策略	16
单细胞转录组扩增操作流程	22
单细胞基因组扩增	26
单细胞基因组测序技术难点	26
单细胞基因组扩增策略	26
单细胞基因组扩增操作流程	28
单细胞扩增产物文库构建	31
单细胞转录组建库—Illumina 平台的测序文库制备	31
转座酶建库流程图	31
操作流程	31
单细胞基因组建库—Illumina 平台的测序文库制备	33
快速建库流程图	33
操作流程	34
03 文库纯化和分选	36
磁珠结构	36
磁珠纯化原理	36
磁珠纯化操作过程	37
磁珠分选原理	37
磁珠分选操作过程	38
04 常见问题及解决方案	39
05 参考文献	41
06 明星产品	42

01 测序背景知识

◆ 二代测序发展简史



图 1：染色体与 DNA 结构

早在 20 世纪 20 年代，人们就开始对遗传物质进行探索，随后科学家发现 DNA 是由四种碱基构成的长链分子。这四种碱基的排列顺序决定了遗传信息的多样性，造就了生物个体之间的千差万别。解密 DNA 排列组合的密码可以帮助人们进行育种改造以及疾病检测。

测序技术最早可以追溯到 20 世纪 50 年代，1953 年沃森和克里克揭示了 DNA 双螺旋结构，次年就出现了关于早期测序技术的报导。1977 年 Sanger 等发明了双脱氧核苷酸末端终止法。随后，ABI 公司在双脱氧末端终止法基础上推出了第一台核酸自动测序仪，自此进入了以人类基因组计划为代表的一代测序的黄金时期。

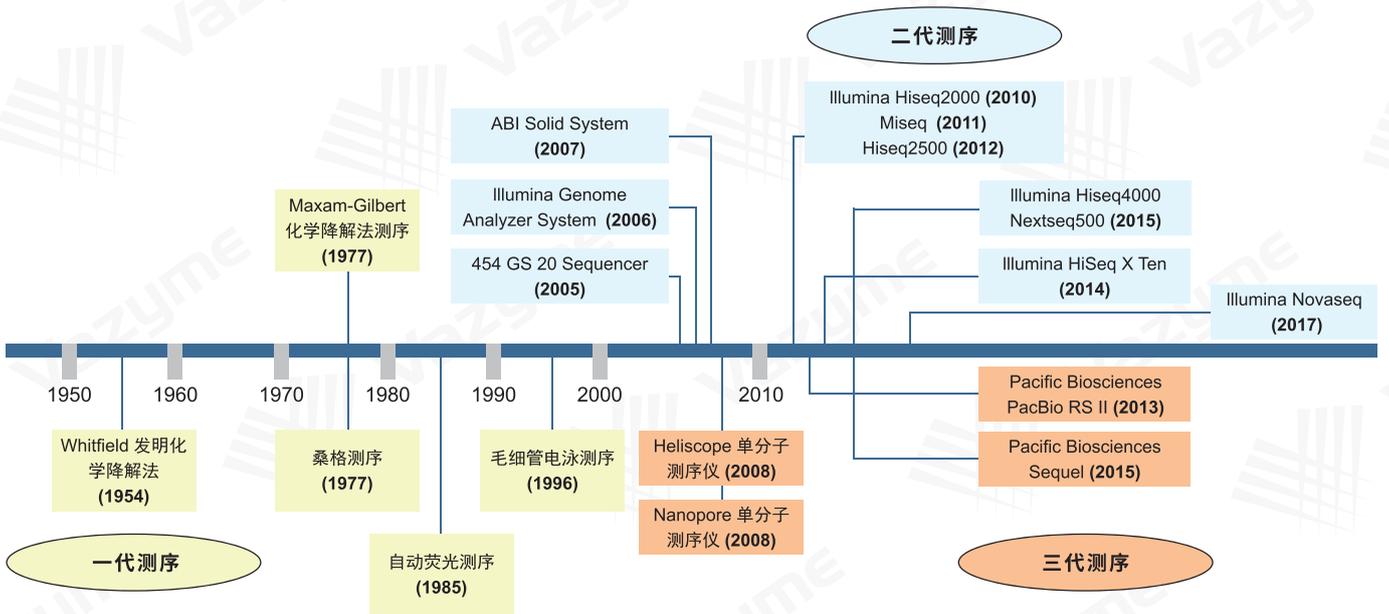


图 2：测序的发展历程

2005 年，一代测序技术的通量低局限性催生了二代测序技术的发展，并在 2010 年前后形成了以 Roche 的 454 技术，Life 的 Ion Torrent 平台，Illumina 的 solexa 技术为代表的三足鼎立的局面，最后由于 Illumina 平台通量高市场接受度广等优势成就了其二代测序的绝对领导地位。二代测序通量高，成本低，极大程度上降低了测序费用，成为目前市面上的主流测序技术。

二代测序读长短，信息分析拼接难等缺点，又促进了以太平洋生物科技公司 and 牛津纳米科技公司为代表的单分子长读长测序技术的发展，即“三代测序技术”。三代测序技术由于目前通量低，成本高，错误率高使得其市场推广受到限制，但若其能突破自身的这些限制因素，未来的市场将不可限量。测序市场目前以二代测序为主，一代、三代测序并存的局面。总之，测序技术的发展正在向着高通量、低成本、长读长的方向发展。

◆ Illumina 测序简介

◇ 文库的基本结构

文库的结构一般如下图所示，中间蓝色部分为待测 DNA 片段，两边红色区域是测序过程中待测 DNA 序列的引物互补序列，黄色和黑色区域是 6/8 个碱基的 index 序列，index 的作用是用来区别不同的文库样本，末端的绿色和橘黄色序列与测序芯片上互补，用于生成 DNA 测序簇。简而言之，建库即在 DNA 片段两端加上测序的接头。一般文库针对 Illumina 测序仪的接头序列是一样的，除转座酶文库及小 RNA 文库在 read1 和 read2 序列上有所不同外，其余的序列都是相同的。Illumina 的测序试剂中包含有传统文库，转座酶及小 RNA 文库的引物，无需另外添加。

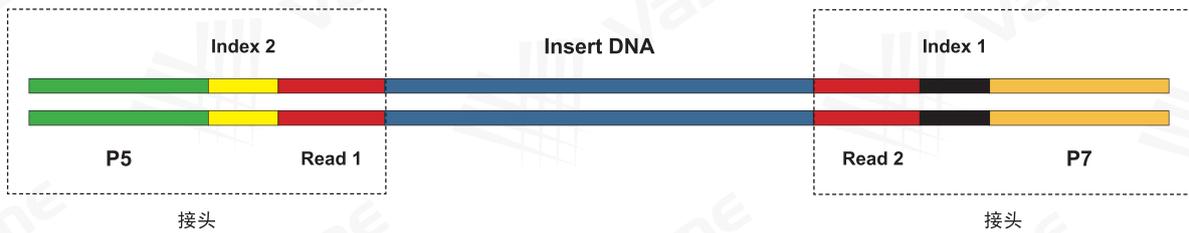


图 3：完整的文库结构

一般文库结构：

5'-AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC|||||||ACACTCTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT-NNNNNN-AGATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCAC|||||||ATCTCGTATGC CGTCTTCTGCTTG-3'

转座酶文库结构：

5'-AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC|||||||TCGTCCGACGCTCAGATGTGTATAAGAGACAG-NNNNNN-CTGTCTCTTATACATCTCCGAGCCCACGAGAC|||||||ATCTCGTATGCCGTCTTCTGCTTG-3'

小 RNA 文库结构：

5'-AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGTTTCAGAGTTCTACAGTCCGACGATC-NNNNNN-AGATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCAC|||||||ATCTCGTATGCCGTCTTCTGCTTG-3'

|||||||: index 2 (i5)

-NNNNNN-: 待测 DNA 序列

|||||||: index 1 (i7)

◇ 测序芯片结构

芯片又叫 flowcell，以下图 Illumina X ten 测序仪的芯片为例，可看到芯片表面有 8 条通道，在每个通道的上下表面做了专门的化学修饰，即共价键的方式将 2 种 DNA 引物（即文库两端 P5 和 P7 的相同 / 互补序列）种在玻璃表面。一条通道即为一个 lane，每个通道的两端有小孔，供测序时的酶、dNTP 及 Buffer 等流过。

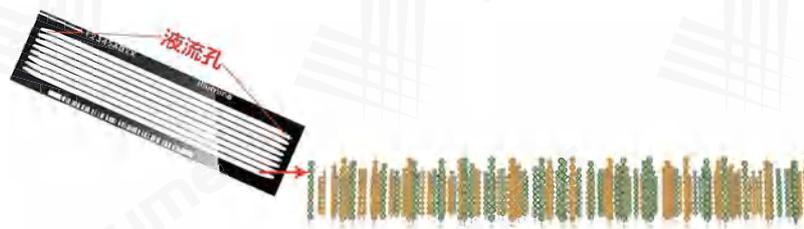


图 4：Illumina 测序芯片图示

◇ Illumina 测序过程

DNA 成簇

构建好的 DNA 文库，需要通过芯片上的引物将文库 DNA 分子种到芯片上，然后通过桥式 PCR 的方式将单分子信号放大成 DNA 簇。

成簇的过程，首先是把变性的单链文库加入到芯片上，文库两端的 DNA 序列与芯片上的引物发生互补配对，这时加入 dNTP 和聚合酶。聚合酶会从引物开始，沿着模板合成出一条全新的 DNA 链。接下来，加入 NaOH 碱溶液。DNA 双链就会在 NaOH 碱溶液的作用下，发生解链，经液流冲洗，原来的那条没有和芯片共价连接的链被冲走了，而和芯片共价连接的链被保留下来。然后，再在液流池里加入中性液体，DNA 新链上的另外一端，与玻璃板上的第二种引物发生互补杂交。接下来，加入酶和 dNTP，聚合酶就沿着第二个引物，合成出第二条链来；然后，再加入 NaOH 溶液，把 DNA 双链解链；连续重复上述过程，DNA 链的数量就会以指数方式增长。经过一系列的桥式 PCR 后，一个文库分子就形成了上千个拷贝的 DNA 分子簇，这样在测序过程中放大的荧光信号就会被仪器检测到。



图 5: Illumina DNA 成簇过程

Illumina 测序原理

Illumina 测序技术基本原理是基于可终止的荧光标记 dNTP 来进行的“边合成、边测序”工作。其中可终止的荧光标记 dNTP 就是一个脱氧核糖 3 号位加入叠氮基团封闭了羟基，保证每次只能够在序列上添加 1 个碱基；另一方面是，碱基部分加入了荧光基团，可以激发出不同的颜色，每一轮反应结束后，进行激光扫描，根据发出来的荧光来判断它是哪个碱基。一个循环完成之后，加入一些化学试剂，把叠氮基团和旁边标记的荧光基团切掉，然后 3' 端的羟基就暴露出来，再加入新的 dNTP 和酶，反应一个循环后，又延长一个碱基。不断重复这个过程就可以把上百个碱基，甚至更多碱基的序列读出来。

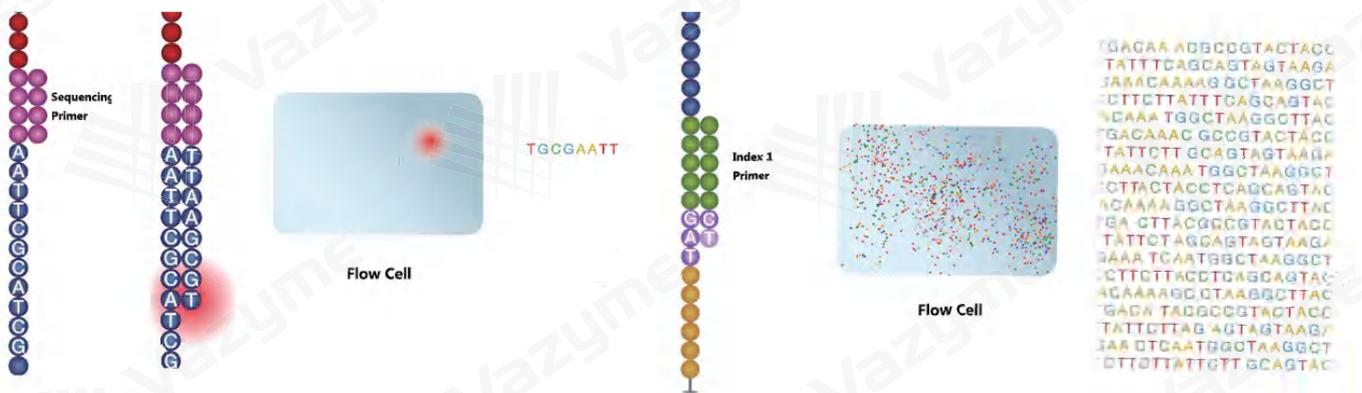


图 6: Illumina 读取过程

◆ 文库质控

上机测序前，对文库进行质控是非常重要的环节。质控过程一般包括三个方面：总核酸定量，文库片段分布检测，有效文库定量。

文库构建完后，首先测定文库的浓度，检测文库的量是否够上机测序。核酸定量的方式有很多种，但是基于紫外分光光度的测定方法都不准确，比如 Nanodrop 或酶标仪，我们推荐使用染料法来进行核酸定量，文库构建比较常用的核酸定量仪器是 Thermo 的 Qubit 仪器。



图 7: Qubit 3.0 仪器



图 8: Agilent 2100 Bioanalyzer 仪器

如果文库浓度符合上机要求，接下来再检测文库片段分布，文库的片段检测可用 Agilent 2100 Bioanalyzer 或其它等效仪器。Illumina 测序平台有不同的测序仪及测序方案，比如单端测 100 bp (SE100)，单端 150 bp (SE150)，单端 250 bp (SE250)，双端 150 bp (PE150)，双端 250 bp (PE250) 等，多长的文库符合上机，这都是基于上机测序的仪器来决定的。文库插入片段太短则测序时会测通读到接头，含接头的 reads 一般都会被过滤掉（小 RNA 文库除外），这样会造成数据浪费；而插入片段太长则测序时 DNA 成簇效率会降低，同时过长的文库也会造成测序质量下降。以 PE150 为例，双端各测 150 bp，读长即为 300 bp，文库两端的测序接头在 120-136 bp 之间，那么分选时就可以选择文库主峰在 400-500 bp 之间的片段。文库在分选过程中由于操作原因，文库实际片段大小可能会与预期有一定的偏差。一般情况下，除 ATAC、cfDNA 和 Small RNA 等特殊文库外，文库中小于 280 bp 和大于 1000 bp 的片段占比不要过大（如大于 20%）都可上机测序。

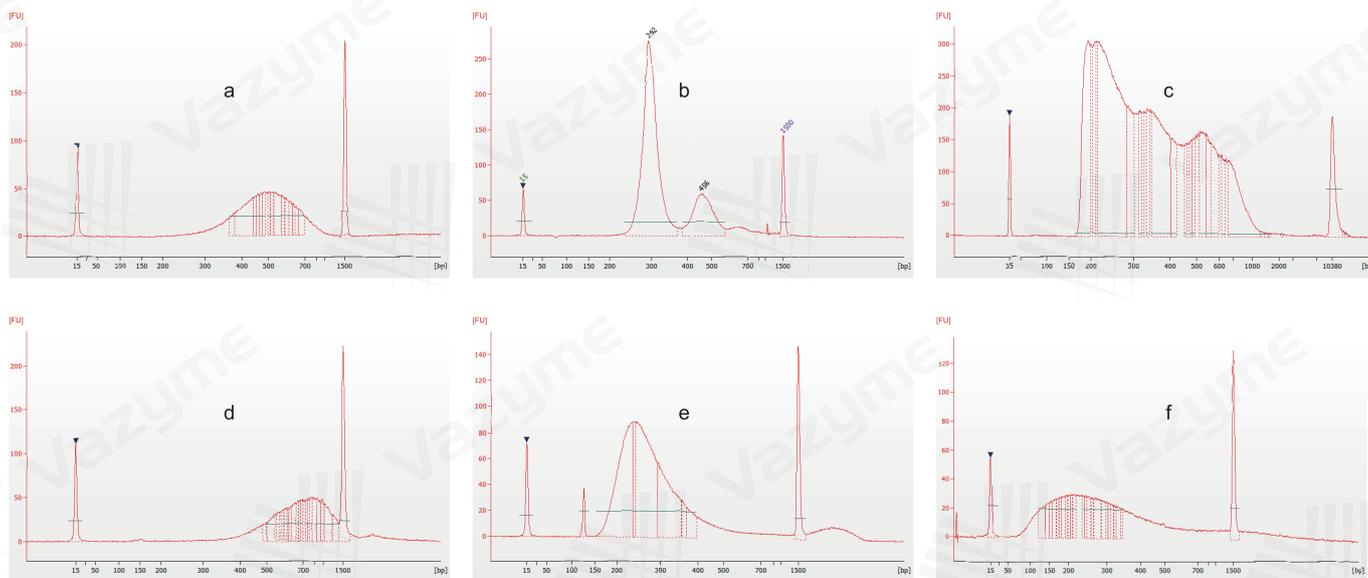


图 9: 文库 2100 质控图。

a 为常规 DNA 文库，b 为 cfDNA 文库，c 为 ATAC 文库，三者为合格的文库；d 为分选偏大的文库，e 为分选偏小且含接头残留的文库，f 为分选偏小的文库，后三者为不合格的文库。

如果文库片段分布符合上机要求，接下来就是对有效文库进行绝对定量。构建的文库，其末端修复效率、加 A 尾效率、接头连接效率等都会导致总文库中含有不带测序接头或单端带接头的文库，即无效文库。无效文库无法进行桥式 PCR 产生测序的 DNA 簇，因此需要在混样前测定有效的文库浓度。有效文库的绝对定量，即 qPCR 的绝对定量，是以芯片上的 P5 和 P7 序列做引物来进行 qPCR 的。

◆ 常规文库测序参数

◇ Raw reads

Raw reads 指下机的初始数据，不同类型的文库需要的测序数据量不同。以人为例，一般全基因组测序需要 90G 左右（30× 测序深度），mRNA 转录组文库测 6G 数据，如果混样不准确会导致测序数据量的偏差。

◇ Clean reads

在初始数据 Raw reads 的基础上，去除其中带接头的 Reads 及低质量（含 N）的 Reads 就是 Clean reads，后续的实验分析都是在 Clean reads 的基础上进行的，有些实验后续分析过程的 Clean reads 也含 Duplication reads 去除。Clean reads 跟上机测序过程和文库大小有关。

◇ Q20/ Q30

Q20/Q30 指测序时每条 Read 中每个碱基正确率大于 99%/99.9% 的数据占比，它是评价测序过程的重要指标，Illumina 不同的测序仪对 Q20 和 Q30 的值要求不同，如 HiSeq 3000/4000，HiSeq X ten 的 Q30 要求大于 75%。

◇ Adapter rate

Adapter rate 即接头残余率，其结果跟文库插入片段大小、测序长度有关。例如，基因组 DNA 文库分选片段主峰为 350 bp，但是文库中小于 280 bp 左右的片段会测到接头，造成 Adapter rate 偏高，Mapping rate 偏低，所以需要将会接头的 Reads 去除后再比对。

◇ Mapping rate

Mapping rate 指 Clean reads 比对到参考基因组的占比。若 Mapping rate 偏低，可从文库污染、标签跳跃上排查，另外含接头的序列未在 Mapping 前去除也是导致比对率低的重要原因。

◇ Coverage rate

Coverage rate 即覆盖度，指 Clean reads 所覆盖到的参考基因组或者扩增子区域的范围，其结果跟测序深度、物种基因组复杂程度、建库试剂有关。

◇ Sequencing depth

Sequencing depth 即测序深度，指数据量测到的碱基总量与该物种基因组大小的比值，跟测序数据量和基因组大小有关。

◇ Duplication rate

Duplication rate (Dup rate) 即冗余率，指测序时读到的完全相同的分子数的百分比。Dup rate 跟很多因素有关，比如测序深度，Dup rate 会随着测序深度的增加而变大；其次模板分子多样性及复杂性对 Dup rate 的影响也非常大，比如扩增子文库，16s 文库，cfDNA 及 Chip-DNA 这类多样性小的文库其 Dup rate 比均衡的基因组文库要大得多；再次在建库过程中会进行 PCR 富集，如果扩增循环数很大或者建库体系 PCR 偏好性也会使得 Dup rate 增大；另外文库接头连接效率如果很低，文库转化率降低，影响文库的多样性也会让 Dup rate 增大；此外，上机过程中测序簇密度，Cluster PCR 等对 Dup rate 影响很大，这就是为什么 PCR-Free 的文库也会有 Dup rate 的原因。

02 单细胞测序

随着现代生物学的发展，细胞群体的研究已不能满足科研需求。由于肿瘤细胞、神经细胞以及干细胞等异质性强，循环肿瘤细胞以及生殖细胞样本量少的特点，使得单细胞测序技术应运而生。

◆ 单细胞测序概述

单细胞测序即在单个细胞水平上对全基因组或转录组进行扩增与测序的一项新技术，其原理是将分离出来的单个细胞的微量全基因组或转录组进行扩增后，再进行高通量测序。

传统测序方法一次处理成千上万个细胞，得到的变异水平也是成千上万个细胞平均后的水平，单细胞测序可以揭示出每个细胞独特的微妙变化，甚至可以发现全新的细胞类型，极大地推动了基因组学领域的发展；同时利用单细胞测序可以精细区分不同细胞类型，使得在单细胞水平进行分子机制研究成为可能。

◆ 单细胞测序基本流程概要

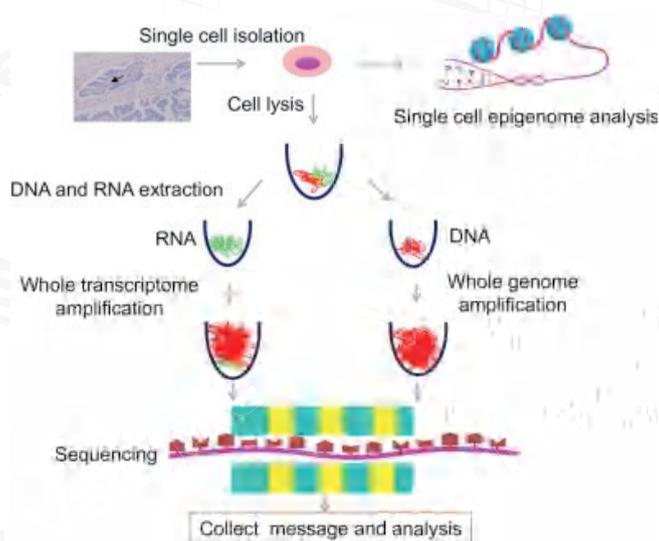


图 1：单细胞测序流程图

单细胞测序基本步骤：

单细胞的分离

DNA/RNA 的提取和扩增
(全基因组 / 转录组扩增)

文库构建
测序以及后续的分析和应用

◆ 单细胞分离

◇ 单细胞分离前注意事项

A、在进行单细胞分离前进行细胞活力检测

在细胞群体中总有一些因各种原因而死亡的细胞，细胞中活细胞所占的百分比即为细胞活力。最简单的活力检测方法就是台盼蓝染色法。经台盼蓝染色后死细胞染成蓝色，活细胞不着色，用血球计数板进行计数后即可计算细胞活力。细胞活力 = (细胞总数 - 死细胞数) / 细胞总数 × 100%。细胞活力越大，实验成功率越高。

B、细胞数量

细胞数量不宜过多，如果细胞数量过多，且没有对细胞进行纯化，细胞碎片会对反应有一定的抑制作用。

C、鉴定细胞携带的组分是否对反应有抑制作用

将预计细胞样品携带的组分加入到对照 DNA 或者 RNA 反应中检测携带组分是否抑制反应。如无法确认携带物对反应的影响，请将细胞重悬于 PBS 中再进行后续操作。

◇ 目的细胞富集

当目的细胞带有表面标记或需要对特定群体的细胞进行分选时，需要对目的细胞进行富集。

A、荧光流式分选 (Fluorescence Activated Cell Sorting, FACS)

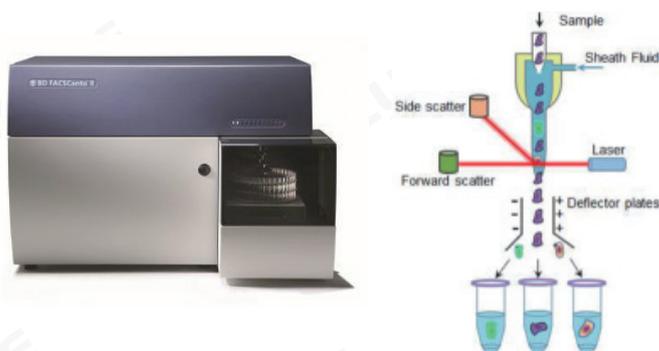


图 2：荧光流式分选

▲ 借助于细胞表面标记或细胞特性对特定群体的细胞进行分选，从而获得单个或群体细胞的方法。此技术主要的优势在于能够进行特异和非特异的分选，并且在分离单细胞时具有很高的精度和通量。

荧光流式分选法是一种根据细胞特异性分子标志或者细胞光散射的特性，通过流式细胞仪，分选单个细胞或者特殊细胞群的技术。

B、免疫磁珠分选 (Magnetic-Activated Cell Sorting, MACS)



图 3：免疫磁珠分选

▲ 孵育时间短，操作过程快，磁珠法效果较好。分选出的是不是单个细胞，后续需要进行分离。

免疫磁珠法分离细胞是基于细胞表面抗原与连接有磁珠的特异性单抗相结合，将用磁珠标记后的细胞通过一个放在强而稳定的磁场中的分选柱进行分选。

◇ 分离方法

单细胞测序的第一步是单细胞的分离，目前使用的方法主要有如下几种：

A、连续稀释法 (Serial dilution test)

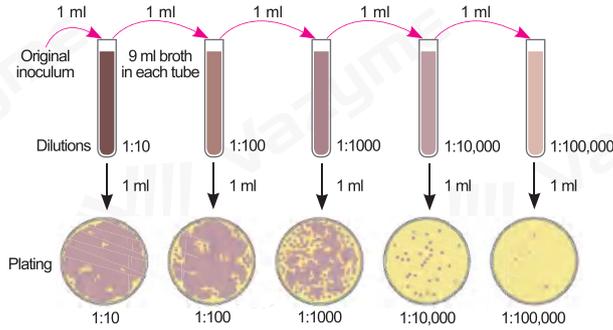


图 4：连续稀释

该技术通过将细胞进行一系列的倍比稀释，最终使细胞处于单个状态。

- ▲ 主要适用于取少量细胞，操作简单，不需要特殊的设备。
- ▲ 依赖于梯度稀释计算，不是直观的单细胞分离，计数不准。

B、口吸管 / 移液器 (Mouth Pipette/Transferpettor)



图 5：口吸管操作

该技术通过将细胞液稀释到一定的浓度，在倒置显微镜下，使用口吸管或移液器进行单细胞吸取的操作。

- ▲ 主要适用于当目的细胞所在的细胞群细胞较少不适合用 FACS 进行直接分离的情况。能够快速高效地控制单个细胞的吸取与释放，对细胞的活性和状态影响不大，尤其在分离胚胎期的内细胞团或单个胚胎干细胞及 HSC 时被广泛采用。
- ▲ 比较耗时，需要事先对操作进行训练。

C、显微操作 (Micromanipulation)

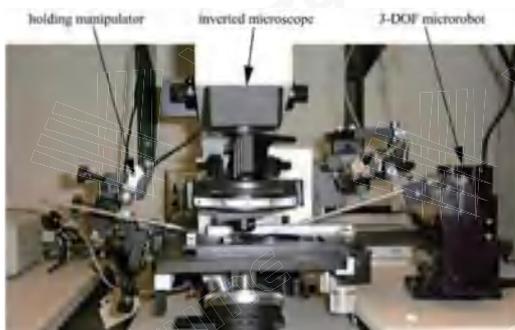


图 6：显微操作

显微操作法是指在高倍倒置显微镜下，利用显微操作器（控制显微镜注射针在视野中移动的机械装置）分离细胞或者早期胚胎的一项技术。

- ▲ 主要应用于目标细胞所在的群体数目较少的样品分离，能够高效的控制单个细胞的吸取和释放。

D、显微切割技术 (Laser capture microdissection, LCM)



图 7：显微切割

▲ LCM 技术可以在显微镜直视下快速、准确获取所需的单一细胞亚群，甚至单个细胞，从而成功解决了组织中细胞异质性问题。

显微切割技术基本原理是通过一层低能红外激光脉冲激活热塑模 - 乙酸乙烯酯 (EVA) 膜，在直视下选择性地将目标细胞或组织碎片粘到该膜上。

◆ 单细胞扩增

◇ 单细胞转录组扩增

一个哺乳动物的单细胞大约含有 10 pg Total RNA，其中 mRNA 含量大约为 0.1-0.5 pg，并不能满足目前建库的要求，所以在文库构建之前需要进行全转录组扩增。

单细胞转录组测序技术难点：

1、PCR 偏差

单个细胞约含有 10 pg total RNA，其中 80% 以上为 rRNA，从单细胞 RNA 到测序文库意味着核酸的扩增量要达到百万倍以上。而在如此高的扩增量情况下不引入 PCR 偏差是一大难题。

2、去除 rRNA

rRNA 在 total RNA 中的占比一般在 80% 以上，如果不加区分的进行逆转录，扩增，建库，很可能测序得到的绝大部分序列都是 rRNA 序列，所以 rRNA 去除成为第二大难题。

单细胞转录组扩增策略：

通常来说，单细胞采集后，进行裂解释放 RNA，RNA 在反转录酶的作用下合成第一链 cDNA。目前单细胞转录组扩增大部分采用 Oligo (dT) 引物进行反转录获得第一链 cDNA，这样可以避免 rRNA 和 tRNA 的干扰，但是无法检测不带 poly (A) 尾的各种 RNA。

在具体策略上又分为指数扩增策略和线性扩增策略，两者之间的区别主要在于指数扩增策略是在逆转录时在 cDNA 两端加入锚定序列，利用锚定序列进行 PCR 扩增；而线性扩增策略主要是采用一些特殊操作，如通过将 T7 启动子连在 Oligo dT 引物上，在 cDNA 合成后启动体外转录流程，实现模板的线性扩增。

1、PCR 指数扩增策略：

A、Template-switch + PCR

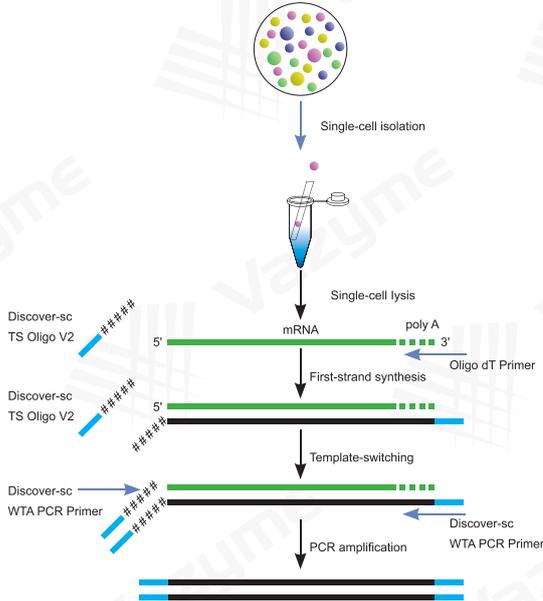


图 8：Template-switch + PCR 原理图

- a、含有 poly (dT) 的引物与 mRNA 进行退火，逆转录引入第一链 cDNA 5' 端的锚定序列。
- b、利用逆转录酶的 template switch 活性，在 cDNA 的 3' 端引入锚定序列。
- c、两端锚定引物进行 PCR 扩增。

B、Polyadenylation + PCR

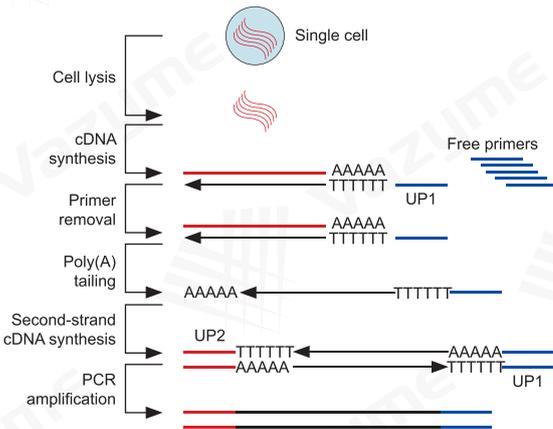


图 9：Polyadenylation + PCR 原理图

- a、先用含有 poly (dT)+ 锚定序列 (UP1) 在逆转录酶的作用下进行逆转录。
- b、消化掉剩余引物。
- c、用末端脱氧核糖核苷酸转移酶在第一链 cDNA 的 3' 末端加上一连串脱氧腺苷酸 (A)。
- d、用含有锚定引物 2 (UP2) 的 poly (dT) 进行二链 cDNA 合成。
- e、用锚定引物 UP1 和 UP2 进行 PCR 扩增富集。

2、线性扩增策略：

A、IVT based methods

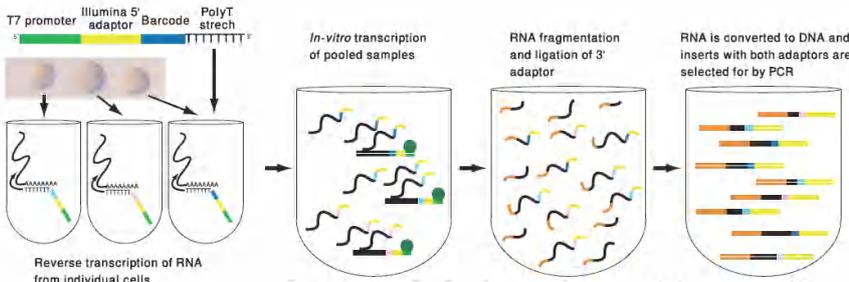


图 10：CEL-Seq 原理图

- a、用结构为 5'-T7 RNA 聚合酶启动子序列-Illumina 5'adapter-barcode-oligo (dT)-3' 的引物进行反转录，合成第二链 cDNA。
- b、将数十个样本混合，进行体外转录。
- c、RNA 片段化并加上 Illumina 3' 端接头。
- d、RNA 转化成 DNA 后用接头序列进行 PCR 扩增。

B、MDA based methods

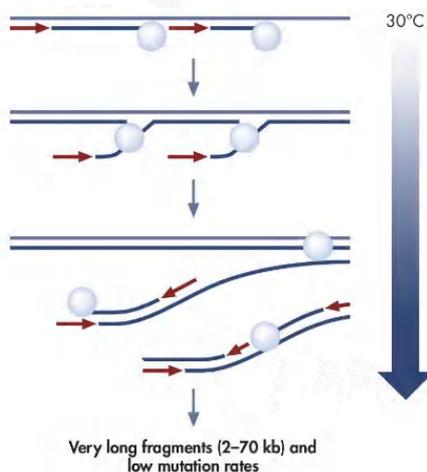


图 11: MDA 法原理图

- a、gDNA wiper 去除基因组 DNA。
- b、Oligo (dT)/ 随机引物 +Oligo (dT) 引物进行逆转录。
- c、合成的 cDNA 进行连接反应。
- d、Sensiphi DNA Ploymerase 进行等温扩增。

C、SPIA based methods

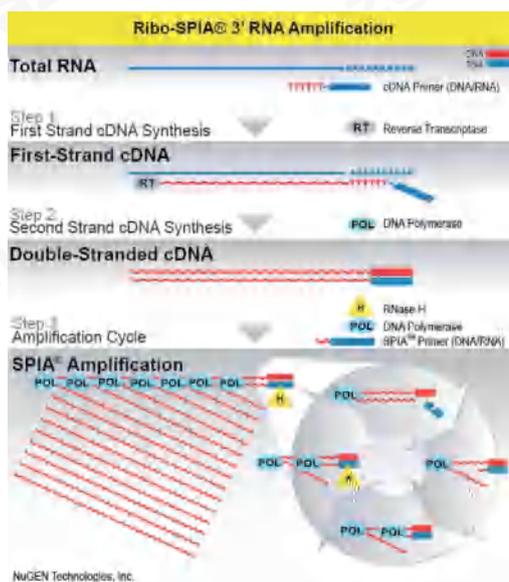


图 12: SPIA 法原理图

- a、使用 DNA/RNA 嵌合的引物进行逆转录。
- b、二链合成。
- c、利用 SPIA 技术进行等温扩增。

以上低通量的方法适用于亚型发现、剪切事件、SNP 鉴定等分析。其中 template+PCR 方法以其高基因检出率、无 5' 和 3' 偏好性等特点，成为单细胞全长转录组测序首选。

2014 年 Fluidigm 尝试性的将 SMART-Seq2 与微流控技术相结合，推出了 C1-96，可以同时捕获 96 个细胞，在同一张芯片上完成细胞捕获、裂解、逆转录及扩增的全过程。

随后 Fluidigm 进一步提高通量，推出 C1-800，同时引入 Cell barcodes，可以区分更多细胞，但是牺牲了转录本全长信息，只能获得 3' 端信息，大部分仅用于基因表达定量。



图 13: C1™ 单细胞全自动制备系统仪器

C1™ 单细胞全自动制备系统主要基于 Fluidigm 的微流控技术，将捕获单细胞，裂解，逆转录和预扩增全过程实现全面自动化，最后得到扩增产物，可进行下游文库构建或者简单的进行实时定量 PCR 分析。



- a、细胞捕获、细胞裂解。
- b、逆转录。
- c、扩增。
- d、文库构建。

图 14: C1™ 单细胞全自动制备系统流程图

类似于 C1-800 能够获得基因表达数据，但不能获得转录本全长信息的高通量单细胞测序平台有以下 5 个，都采用类似的 UMIs 标签技术，可以混合多个样品，允许基因水平的定量优化。

1、BD Rhapsody™ Single-Cell Analysis System



图 15: BD Rhapsody™ Single-Cell Analysis System 仪器

BD Rhapsody 扫描仪提供自动化细胞计数和细胞样本活性测试，帮助用户制备适用于卡式芯片单细胞捕获的最佳浓度的样本。扫描仪提供了卡式芯片上微球捕获细胞的计数。BD Rhapsody 上样台轻巧便携，可在实验室内轻松移动。同时还提供生物信息学途径和可视化工具。这些工具包括 UMI 分析算法和可视化工具，即使没有经验的用户也可分析和理解单细胞数据。

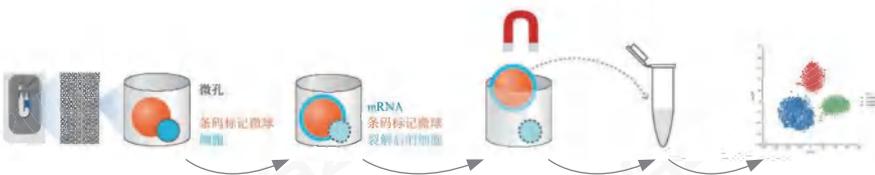


图 16: BD Rhapsody™ Single-Cell Analysis System 流程图

- a、在微孔中，一个细胞与一个条码标记微球匹配。
- b、裂解细胞将 mRNA 与微球上条码标记的捕获寡核苷酸杂交。
- c、微球回收。
- d、cDNA 合成。
- e、测序和构建单细胞基因表达谱。

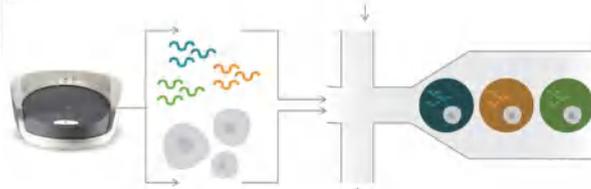
2、Illumina® Bio-Rad® Single-Cell Sequencing Solution



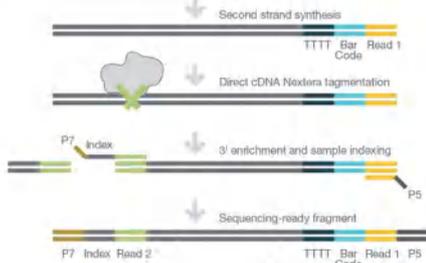
图 17: Illumina® Bio-Rad® Single-Cell Sequencing Solution 仪器

Illumina Bio-Rad 单细胞测序解决方案利用 Bio-Rad 的 Droplet Digital™ 技术来捕获纳米大小微滴中的单细胞，此微滴中包含了细胞裂解和标记的所有试剂。每个细胞在其各自的微滴中被裂解，而每个转录本被带上独特的分子条形码（UMI）。然后，将所有微滴的 cDNA 混合进行第二链合成，再利用 Illumina 的 Nextera® tagmentation 技术进行文库制备。

Isolate and barcode single cells using the Bio-Rad ddSEQ™ Single-Cell Isolator



Prepare library using Nextera® technology



- a、捕获并标记单细胞。
- b、逆转录，每个分子被带上 UMI。
- c、混合 cDNA 合成第二链。
- d、利用转座酶构建文库。

Sequence efficiently using Illumina sequencing systems and analyze and store data with the BaseSpace Sequencing Hub

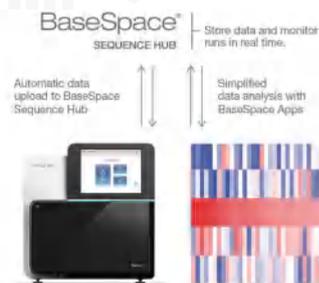


图 18: Illumina® Bio-Rad® Single-Cell Sequencing Solution 流程图

Illumina® Bio-Rad® Single-Cell Sequencing Solution 操作简单、一次性可测试 8 个样本，捕获 500~10000 个单细胞，成本较低。

3、ICELL8 Single-Cell System



图 19: ICELL8 Single-Cell System 仪器

ICELL8 利用 WaferGen SmartChip TE 平台筛选细胞，该平台拥有 5184 个反应孔，可进行单细胞 RNA 测序样本的制备、扩增、表达谱建库测序、生物信息分析，快速得到样本间的基因表达差异。

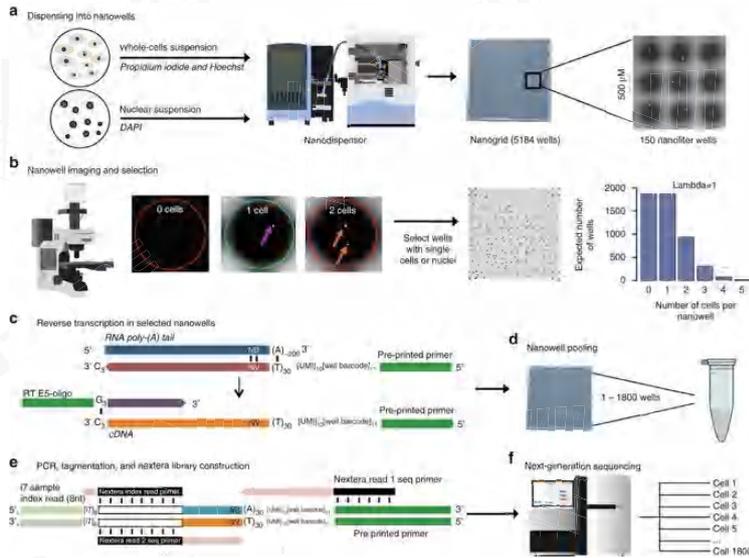


图 20: ICELL8 Single-Cell System 流程图

通过 MultiSample NanoDispenser (MSND) 能够准确的对 4 cm² 的 ICELL8 芯片上搭载的 5184 个微孔进行 50 nL 的分注。同时结合专用软件 CellSelect 自动选择单细胞, 实现高通量且迅速的单细胞分选工作。

- a、经 MSND 分注细胞, 使用磁珠进行捕获。
- b、成像以及孔选择。
- c、经 MSND 分注 RT 试剂。
- d、cDNA 合成。
- e、cDNA 回收、纯化、扩增。
- f、文库构建。

4、Chromium Single Cell Gene Expression Solution



图 21: Chromium Single Cell Gene Expression Solution 仪器

Chromium Single Cell Gene Expression Solution 是 10 × Genomics 公司于 2016 年推出的平台, 该平台可通过快速高效的单细胞标记、测序和分析, 获得单细胞水平的数字化基因表达谱, 对复杂细胞群体进行深入细致分析, 绘制大规模单细胞表达图谱。该平台一次可以完成 80,000 个细胞的捕获, 单个样本捕获效率可以达到 65%。

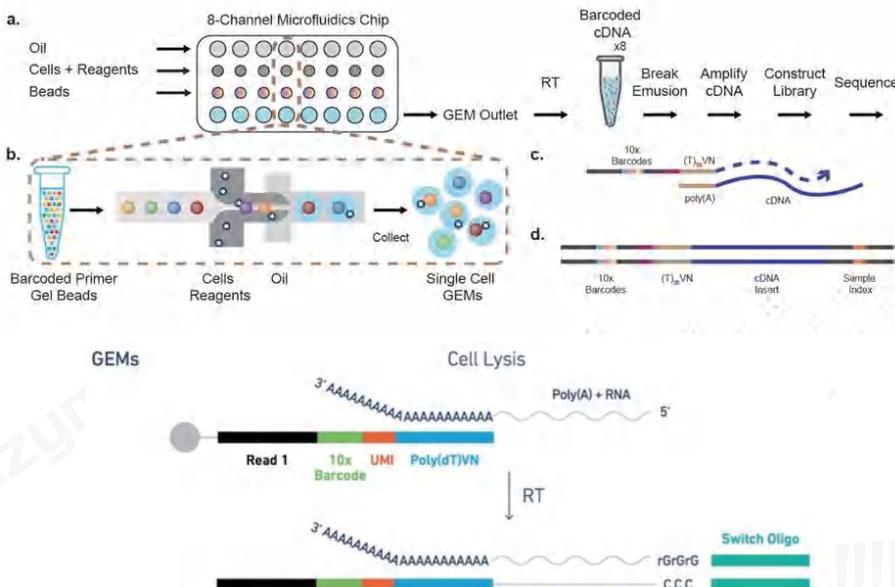


图 22: Chromium Single Cell Gene Expression Solution 流程图

- a、通过 Chromium 将单个细胞与单个凝胶微珠, 油相混合在一起, 形成油包水的小微滴。
- b、细胞裂解并进行逆转录。
- c、破乳并进行 cDNA 扩增。
- d、文库构建。

5、Microwell-Seq

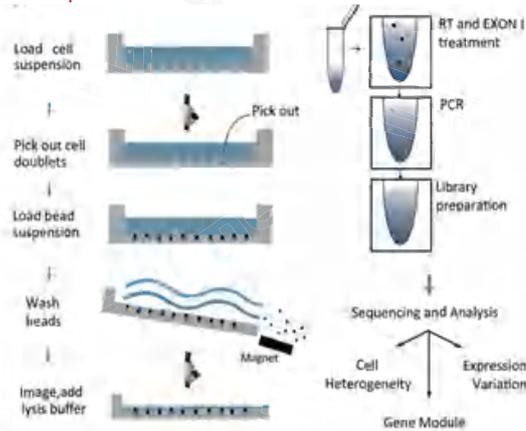


图 23: Microwell-Seq 原理图

- a、琼脂糖微孔板捕获细胞。
- b、镜检，用毛细管去除单一微孔的多余细胞。
- c、加入带有 barcode 的磁珠。
- d、去掉多余磁珠。
- e、加入裂解液进行裂解，收集转移清洗磁珠。
- f、逆转录、内切酶去除寡核苷酸。
- g、PCR 扩增。
- h、文库构建。

该平台可实现高通量单细胞 RNA 测序，即可同时对成千上万个细胞进行单细胞水平的转录组分析，并能实现从细胞悬液到双链 cDNA 的一站式过程。

自动化平台与传统单细胞建库优劣势比较

	自动化平台 (C1 除外)	传统单细胞建库试剂盒
优势	1、对于需要分析大量单细胞样本的细胞分型实验可以节约成本和时间的 2、带有分子标签 UMI，可以防止扩增偏好性	1、单个细胞可以进行独立扩增，单次反应成本小 2、样本兼容 1-1000 个细胞或者微量 RNA 3、可以根据细胞的特点选取特定的单细胞 4、基因检出率可达万个
劣势	1、仅对 RNA3' 端测序，不能分析剪切体和融合蛋白 2、不适合于少量样本 3、基因检出率低 4、捕获效率低	1、单细胞分离比较繁琐 2、建库操作步骤耗时 3、分析大量单细胞样本时时间和成本高。

单细胞转录组扩增操作流程：

Template-switch + PCR 技术以其高基因检出率、操作简便、起始量低、扩增灵敏度高、无 5' 和 3' 偏好性等特点，成为目前单细胞转录组测序的首选方案。

以 Discover-sc® WTA Kit V2 (Vazyme #N711) 为例，对单细胞转录组扩增以及文库构建的操作流程与注意事项进行概述。

注意事项

- A、细胞培养基或样品中其他组分可能对反应产生抑制，尽量减少不必要的样品体积以降低可能对反应体系带来的影响。
- B、本技术使用 Oligo dT Primer 扩增带有 poly A 序列的 RNA，确保体系中无带 poly A 序列 DNA 的干扰。
- C、本技术中细胞裂解方式不能有效裂解细胞壁，带有细胞壁的真核生物细胞需在去除细胞壁之后再行裂解，或者使用纯化后的 RNA 进行反应。
- D、不能使用固定过的细胞。
- E、本技术可以 1-1000 个细胞为起始模板进行扩增，过多的细胞会对反应产生抑制作用。
- F、因为细胞基因表达的瞬时性，请确定细胞的获取方式对细胞活性的影响，在每次收集完细胞样品后对细胞活性进行鉴定，死亡的细胞会发生明显的 RNA 降解并导致反应失败。鉴定合格后建议立即进行反应，不适当的保存条件也会导致细胞中的 RNA 降解。
- G、如需储存一段时间后再反应，制备好的细胞样品于 -70℃ 或更低温度保存。

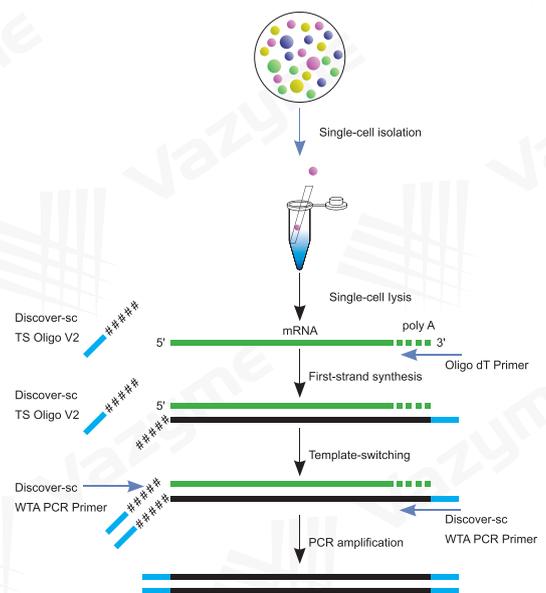


图 24：基于 Template-switch + PCR 技术原理图

操作流程

A、第一链 cDNA 合成 (在超净台中操作)

1、解冻试剂

Oligo dT Primer	冰上充分溶解后震荡混匀并离心收集后置于冰上
dNTP Mix	
Nuclease-free H ₂ O	
5 × FS Buffer V2	
DTT	
RNase Inhibitor	冰上溶解后，轻弹混匀并离心收集后置于冰上
10 × Lysis Buffer V2	
Discover-sc Reverse Transcriptase	
Discover-sc TS Oligo V2	

▲ 5 × FS Buffer V2 可能会出现沉淀，使用前请震荡混匀使沉淀充分溶解。

▲ 10 × Lysis Buffer V2 应避免出现气泡。

2、配制 10 × Sample Buffer

组分	体积
10 × Lysis Buffer V2	19 μl
RNase Inhibitor	1 μl
Total	20 μl

3、样品准备

组分	阴性对照	阳性对照	待测样品
10 × Sample Buffer	1 μl	1 μl	1 μl
Nuclease-free H ₂ O	5 μl	0-4.5 μl	0-4.5 μl
Diluted Control Total RNA	-	0.5-5 μl	-
RNA/ 细胞样品	-	-	0.5-5 μl
Total	6 μl	6 μl	6 μl

▲ 实验设计阳性对照和阴性对照。

▲ 如果细胞需储存一定时间后再进行扩增，此步制备好的细胞样品可于 -70°C 或更低温度保存。如需运输，请使用干冰运输。

细胞样品短暂离心收集并于室温孵育 5 min。对照组直接短暂离心收集置于冰上。

4、将样品置于冰上，按照下表配制反应体系

组分	体积
步骤 3 RNA/ 细胞样品	6 μl
Oligo dT Primer	2 μl
dNTP Mix	2 μl
Total	10 μl

5、在 PCR 仪中进行如下反应

温度	时间
72°C	3 min
立即置于冰上	2 min

▲ 选择有热盖功能的 PCR 仪。将 PCR 仪提前预热至 72°C，反应结束后立即取出，置于冰上至少 2 min。

6、按下表配制 RT Mix

组分	体积	
步骤 5 产物	10 μ l	
Nuclease-free H ₂ O	2.5 μ l	□
5 × FS Buffer V2	4 μ l	■
DTT	1 μ l	■
RNase Inhibitor	0.5 μ l	■
Discover-sc TS Oligo V2	1 μ l	■
Discover-sc Reverse Transcriptase	1 μ l	■
Total	20 μ l	

▲ 按表中顺序依次加入试剂，用移液器轻轻混匀，并短暂离心收集，请勿涡旋。

7、在 PCR 仪中进行如下反应

组分	时间
42°C	90 min
70°C	15 min
4°C	Hold

▲ 反应结束后，如果不立即进行下一步反应，可以将产物储存在 4°C 过夜，放置时间请勿超过 12 小时，防止产物降解。

B、全长 cDNA 扩增

1、解冻试剂

Nuclease-free H ₂ O	冰上充分溶解后震荡混匀并离心收集后置于冰上
Discover-sc WTA PCR Primer	
2 × Discover-sc PCR Mix	

▲ 2 × Discover-sc PCR Mix 会出现沉淀，使用前请震荡混匀使沉淀充分溶解。

2、按照下表配制反应体系

组分	体积	
第一链 cDNA 合成产物	20 μ l	
Nuclease-free H ₂ O	4 μ l	□
Discover-sc WTA PCR Primer	1 μ l	■
2 × Discover-sc PCR Mix	25 μ l	■
Total	50 μ l	

▲ 使用移液器轻轻混匀，短暂离心收集后置于冰上。

3、在 PCR 仪中运行以下程序

组分	体积	循环数
98°C	1 min	
98°C	10 sec	X
65°C	15 sec	
72°C	6 min	
72°C	5 min	
4°C	Hold	

▲ 扩增循环数参考：

总 RNA 作为起始	细胞作为起始	参考循环数
10 ng	1,000 cells	7-8
1 ng	100 cells	10-11
100 pg	10 cells	14-15
10 pg	1 cell	17-18

PCR 循环数在以细胞为起始模板的扩增反应中存在较大的变动，不同的细胞 RNA 含量存在较大差异，请根据样品酌情增减扩增循环数。

4、反应结束后将产物置于冰上

C、cDNA 扩增产物纯化

一般情况下，根据使用的起始模板不同，成功的反应可以产出 2-20 ng 扩增产物，纯化时推荐使用磁珠法进行纯化，可使用 VAHTS DNA Clean Beads (Vazyme #N411) 进行纯化，具体纯化操作参考 P37。

纯化操作注意事项：

- 使用前请将 VAHTS DNA Clean Beads 震荡混匀并置于室温至少 30 min。
- 磁珠比较粘稠，用移液器时确保能够取到足够的体积并缓慢打出。
- 配置新鲜的 80% 乙醇，每个样品约需要 400 μ l。
- 洗脱时确保磁珠只是刚刚晾干，磁珠此时看起来没有光泽。若磁珠没有完全晾干，酒精仍然残留在样品中，酒精会降低 cDNA 的洗脱速率，并可能干扰下游反应。若磁珠晾的太干，则会降低 cDNA 的洗脱效率，最终降低产量。
- 如果少量的磁珠不再吸附在磁力架上，用移液器在上清中吹打混匀未吸附的磁珠，使其重新悬浮，继续孵育直至没有磁珠残留在上清中。

D、cDNA 扩增产物检测

cDNA 扩增产物的产量与片段分布是判断其是否合格的重要指标。

1、产量检测

一般情况下，根据使用的起始模板不同，成功的反应可以产出 2-20 ng 扩增产物。

因为产物浓度比较低，使用任何以吸光度进行定量的方法都有可能造成偏差。浓度测试的准确与否，将直接影响后续建库的投入量，导致文库产出的偏差。

推荐使用 Qubit 仪器进行浓度测定，可以使用 Vazyme #EQ111 进行测试，操作过程简单，只需要配制两个标准品，以及进行工作液的混合即可进行测试。



图 25: Qubit 3.0 仪器

2、峰型检测

推荐使用 Agilent 2100 Bioanalyzer 的 High Sensitivity DNA Chip 进行检测。



图 26: Agilent 2100 Bioanalyzer 仪器

正常的结果：

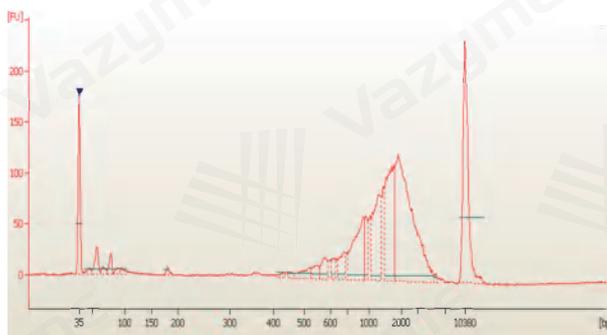


图 27: 2100 质检图

一般情况下，片段大小分布于 400-10000 bp，文库的 peak 位于 2000 bp 左右。

◇ 单细胞基因组扩增

一个哺乳动物的单细胞大约含有 6 pg DNA，无法满足文库构建需求，所以必须先进行扩增，同时尽量减少错误。

单细胞基因组测序技术难点：

1、均一性

常规文库构建过程不能将起始 DNA 100% 转化成最终文库，单个细胞中仅有两套拷贝直接建库会导致很多区域没有覆盖，因此建库前均一、高覆盖的扩增至关重要。

2、扩增效率

从两个拷贝扩增到足够建库的 DNA 量，要经过多次扩增，这就需要很高的扩增效率，而一般的线性扩增效率低。

单细胞基因组扩增策略：

目前基因组扩增技术主要有以下四种：

1、简并寡核苷酸引物 PCR 扩增（DOP-PCR）

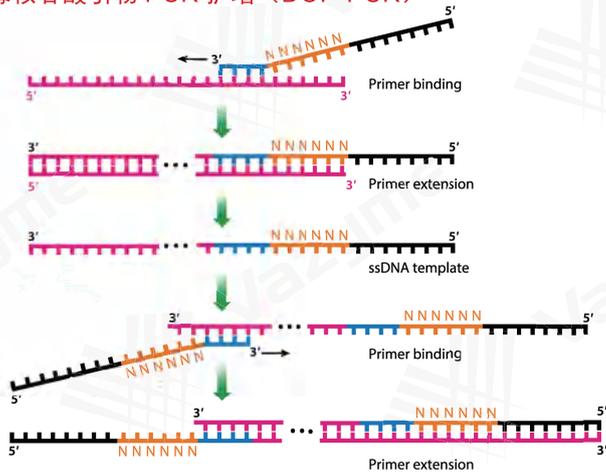


图 28：DOP-PCR 原理图

- a、引物 3'-ATGTGG-NNNNNN-CCGACTCGAG-5' 与基因组模板进行退火。
- b、DNA 聚合酶进行指数扩增。

2、多重置换扩增（MDA）

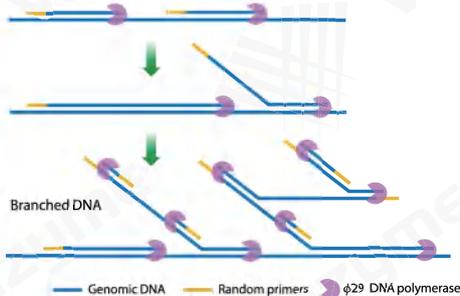


图 29：MDA 原理图

- a、随机引物与模板退火结合，在 Phi29 DNA 聚合酶的作用下延伸。
- b、新生成的链被置换并成为扩增反应的模板继续扩增。

MDA 法相对于 DOP-PCR 法拥有更高的基因组覆盖度，同时由于 Phi29 DNA 聚合酶具有很高的 3'-5' 核酸外切酶活性和校对活性，Phi29 DNA 聚合酶具有很高的保真性，使得 MDA 法进行 SNV 分析，以及构建大片段文库上有着显著的优势。

3、MALBAC (Multiple Annealing and Looping-Based Amplification Cycles)

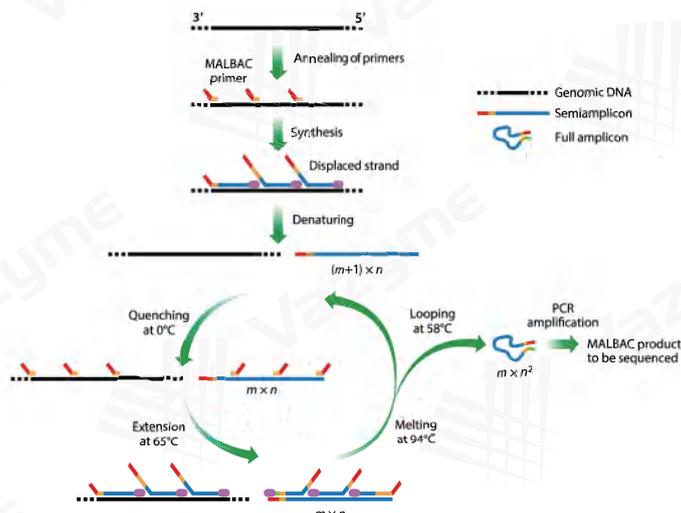


图 30: MALBAC 原理图

- a、0°C时, 8 nt 随机引物与模板退火。
- b、梯度升温至 65°C时, 在具有链置换活性的聚合酶作用下发生链置换聚合反应, 得到半扩增子。
- c、94°C变性, 0°C退火以及 65°C延伸循环后, 半扩增子变成全扩增子, 58°C形成 loop 结构。
- d、使用引物进行 PCR 扩增。

4、LIANTI (Linear Amplification with Transposon Insertion)

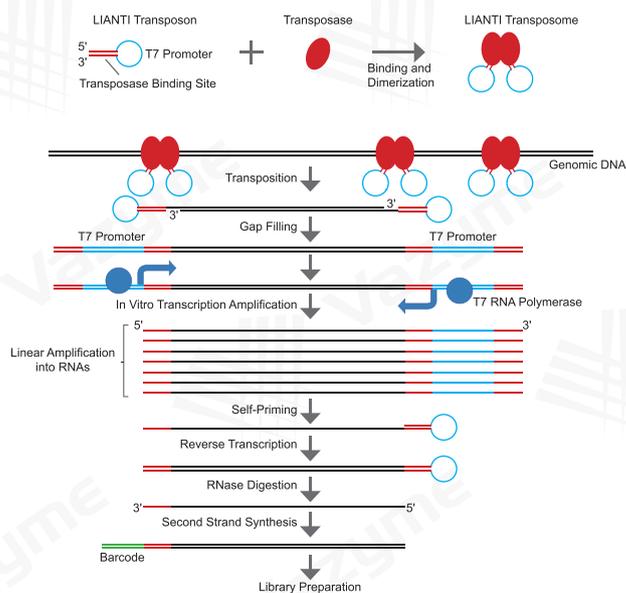


图 31: LIANTI 原理图

- a、含有 T7 启动子的 Tn5 转座复合体进行打断。
- b、补平 gap。
- c、体外转录。
- d、成环。
- e、逆转录。
- f、RNase 消化。
- g、二链合成。
- h、文库构建。

这四种方法, 前面三种方法在市面上已经有产品在销售, 各试剂盒特点如下表所示:

基因组扩增方式	主要原理	基因覆盖度	检测 SNV 水平	检测 CNV 水平
DOP-PCR	部分随机引物法	低	较为准确	准确
MDA*	多重置换扩增	高	准确	准确
MALBAC	多次退火环状循环扩增技术	中	较为准确	准确

* 诺唯赞单细胞全基因组扩增试剂采用 MDA 多重置换扩增技术。

三种基因组扩增技术, 具体使用的方法取决于研究目的。

单细胞基因组扩增操作流程：

MDA 使用的 Phi29 DNA 聚合酶的高效率及高保真性，使得 MDA 法在对 SNV 的分析以及构建大片段文库方面有着显著优势。接下来以 Discover-sc™ Single Cell Kit V2 (Vazyme #N602) 为例，对单细胞全基因组扩增以及文库构建的操作流程与注意事项进行概述。

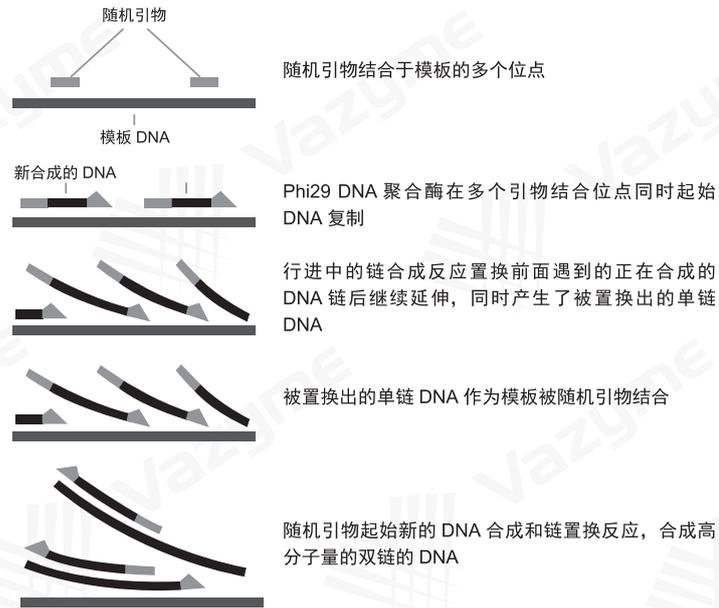


图 32：基于 MDA 技术原理图

注意事项

- 1、本技术检测灵敏度极高，实验操作应在正压的超净工作台中完成，请勿与普通 PCR 操作平台交叉使用，避免样品受外界因素干扰或 DNA 污染。
- 2、本技术中所有组分应储存于无核酸污染的环境中，以免试剂发生污染导致实验失败。
- 3、本技术中的细胞裂解方式不能有效裂解细胞壁，带有细胞壁的真核生物细胞需要在去除细胞壁之后再行裂解，或者使用纯化后的 DNA 进行反应。哺乳动物细胞可直接用本方案进行裂解扩增。
- 4、以低质量的样品为模板会影响最终的扩增产物质量，应尽量避免使用大量降解或片段化的 DNA 作为起始样本。
- 5、本技术单个扩增反应得到的全基因组浓度较高，应尽量避免将产物带回公共实验操作区，防止对其他实验造成气溶胶污染。
- 6、实验操作过程中，推荐同时设置阳性与阴性对照以验证体系是否正常工作。

操作流程

A、基因组扩增

1、解冻试剂

DTT, 1 M	冰上充分溶解后震荡混匀并离心收集后置于冰上
Buffer D	
Discover-sc Reaction Buffer	
Discover-sc DNA Polymerase	冰上充分溶解后轻轻混匀并离心收集后置于冰上

2、准备 Buffer D2

组分	体积	
DTT, 1 M	4 μ l	■
Buffer D	36 μ l	■
Total	40 μ l	

▲ 按照这个体系配制的 Buffer D2 体积足够 12 个反应，用完可以储存于 -20°C ，储存时间勿超过 3 个月。

3、将 4 μ l 细胞样品 (重悬于 PBS 中) 加入到 PCR 管中

▲ 如果样本体积少于 4 μ l，则用 PBS 补足到 4 μ l。

4、加入 3 μ l Buffer D2，轻弹管壁混匀并短暂离心收集

▲ 此步制备好的细胞可于 -70°C 或更低温度保存。

5、 65°C 孵育 10 min

6、加入 3 μ l Buffer N，轻弹管壁混匀并短暂离心

▲ 勿使用移液器吹打，避免细胞样品粘附到移液器的吸头上。

7、准备反应混合液

组分	体积	
H ₂ O	8 μ l	□
Discover-sc Reaction Buffer	30 μ l	■
Discover-sc DNA Polymerase	2 μ l	■
Total	40 μ l	

▲ 勿使用移液器吹打，避免细胞样品粘附到移液器的吸头上。

8、立即将 40 μ l 反应混合液加入到准备好的 10 μ l DNA 样品中 (第 5 步)，轻弹管壁混匀并短暂离心收集

9、 30°C 孵育 6 h

▲ 反应时间可以稍微进行调节，如果产物不需要很多，可以缩短时间到 2 小时。

10、 65°C 孵育 5 min 失活 Discover-sc DNA Polymerase

B、扩增产物分析

1、电泳分析

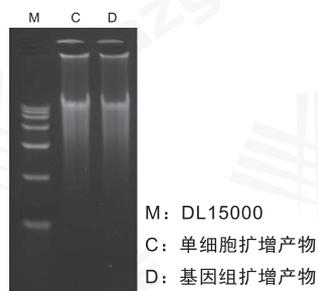


图 33: 扩增产物电泳图

▲ Discover-sc™ Single Cell Kit V2 扩增产物用 0.6% 琼脂糖凝胶进行电泳，大小在 2-100 kb 之间，平均长度大于 20 kb。

2. qPCR 分析

1)、取扩增产物稀释到 5 ng/ul 进行实验

2)、配制 qPCR 反应体系

组分	体积	
Discover-sc AceQ Master Mix	10 μ l	□
Discover-sc Primer	0.8 μ l	■
ROX Dye 1	0.4 μ l	■
模板 DNA	1 μ l	
H ₂ O	7.8 μ l	□
Total	20 μ l	

qPCR 反应程序设置

程序	温度	时间	循环数
预变性	95°C	5 min	1
循环反应	95°C	10 sec	40
	60°C	30 sec	
	95°C	15 sec	
溶解曲线	60°C	15 sec	1
	95°C	60 sec	

▲ 实验应当设置一个阴性对照（即无模板对照）以检测 qPCR 引物、qPCR 试剂以及整个反应中可能存在的污染，同时设置一个阳性对照（基因组）以确认 qPCR 检测的效果。

▲ 提供的 16 对引物仅限于检测人源 DNA 的完整性。

▲ 扩增产物是高浓度基因组 DNA，必须进行稀释后使用，否则会影响扩增效率。

▲ 反应体系配制时请于超净台内进行，推荐使用带滤芯的枪头，避免发生污染。

3)、数据分析

反应结束后确认各组 C_T 值及溶解曲线，扩增产物特异与否也可用琼脂糖凝胶电泳进行确认。阴性对照反应不能生成明显的信号，否则表明 qPCR 过程中存在污染。每个样本的反应 C_T 值落在 22-28 之间较为准确，若 C_T 值大于 32 时则可以认为 qPCR 检测无效。

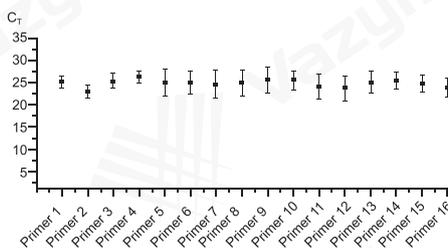


图 34: qPCR C_T 值统计图

4)、结果评定

成功扩增的产物表现为 16 对 qPCR 引物都能正常扩增，扩增不完整的样本不建议进行后续的应用。

◆ 单细胞扩增产物文库构建

◇ 单细胞转录组建库—Illumina 平台的测序文库制备

根据 Discover-sc® Single Cell WTA Kit V2 (Vazyme #N711) 进行扩增后的 dscDNA 的量能达到 2-20 ng，可以选择转座酶法或者常规的 DNA 建库方法，但是因微量样本的精确打断与高效回收难以控制，同时单细胞转录组扩增产物两端的锚定序列在进行常规建库时需要进行额外的去除处理，操作较为繁琐，推荐使用转座酶法进行文库构建。鉴于以上原因，使用转座酶法建库是一个不错的选择。其将打断与接头连接一步进行，同时还能实现两端锚定序列的去除。以 TruePrep™ DNA Library Prep Kit V2 for Illumina(Vazyme #TD502/TD503) 为例进行文库构建。

转座酶建库流程图

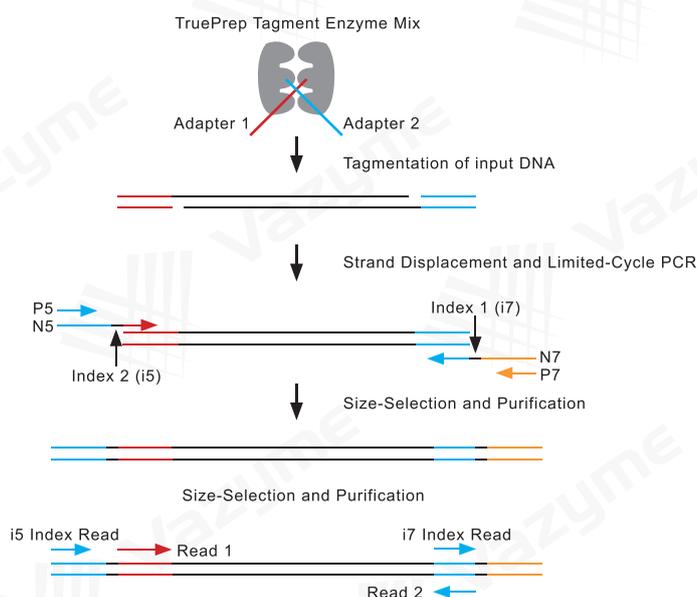


图 35：转座酶建库流程图

打断：55°C 孵育 10 min，TTE Mix 将 DNA 随机片段化的同时在片段末端接上接头。

扩增：经双端或单端 index Primer 扩增补齐接头序列。

分选：扩增产物经大小分选后即可为可测序文库。

操作流程

1 ng (Vazyme #TD503) 起始进行实验操作

A、打断

1、解冻试剂

5 × TTBL	冰上充分溶解后震荡混匀并离心收集后置于冰上
5 × TAB	
N5XX	
N7XX	
TTE Mix V1	冰上充分溶解后轻轻混匀并离心收集后置于冰上
TAE	
5 × TS	室温溶解，融化后置于室温

▲ 确认有无沉淀。如有沉淀，37°C 加热并涡旋振荡充分混匀，沉淀即可溶解。

2、在灭菌 PCR 管中配置如下反应体系

组分	体积
5 × TTBL	4 μl
1 ng DNA	x μl
TTE Mix V1	5 μl
ddH ₂ O	To 20 μl

3、在 PCR 仪中运行如下反应程序

温度	时间
105°C	热盖
55°C	10 min
10°C	Hold

- ▲ 反应完成后应立即加入 5 × TS 终止反应，否则 DNA 样品将过度片段化，导致最终文库片段变小。
- ▲ 终止反应必须置于室温，否则会影响最终文库片段大小。

4、反应完成后立即向产物中加入 5 μl 5 × TS，使用移液器轻轻吹打充分混匀，置于室温放置 5 min

5、立即进行 PCR 富集

B、PCR 富集

1、将 PCR 管置于冰上，配制如下反应体系

组分	体积
ddH ₂ O	4 μl
片段化产物	25 μl
5 × TAB	10 μl
N5XX	5 μl
N7XX	5 μl
TAE	1 μl
Total	50 μl

▲ Index 选择可以根据实验需求进行选择

试剂盒名称	货号	Index 种类		正交	试剂可用次数
		i5	i7		
Trueprep Index Kit V2	TD202	8 种	12 种	96 种	192 次
Trueprep Index Kit V3	TD203	16 种	24 种	384 种	768 次
Trueprep Index Kit V4	TD204-TD207	1 种	96 种	/	各 192 次

注：TD202 与 TD203 不能混用

2、使用移液器轻轻吹打充分混匀，将反应管置于 PCR 仪中，进行如下反应程序

组分	体积	循环数
105°C	热盖	
72°C*	3 min	
98°C	30 sec	
98°C	15 sec	15
60°C	30 sec	
72°C	3 min	
72°C	5 min	
4°C	Hold	

- ▲ * 72°C 孵育步骤用于进行链置换反应，请勿删除该步骤。

扩增循环数选择 15，可以选择上下调节。扩增循环数越少，扩增 Duplication 越低，但是文库产量也相应降低。

C、磁珠分选

分选步骤参考 P38

选择主峰为 550 的方案

- ▲ 因为转座酶含有 19 bp 的核心序列，如果分选主峰小的话，有可能导致文库被测穿。

D、文库质控

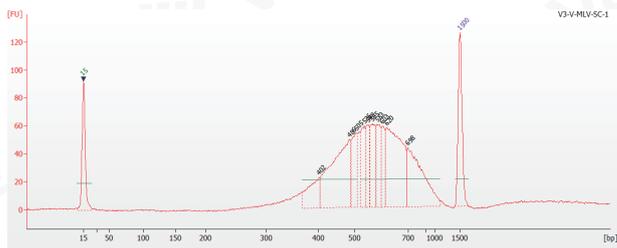
1、文库产量低，推荐使用 Qubit 进行浓度测试

取 1 μl 样本使用 Qubit 仪器和 Equalbit™ dsDNA HS Assay Kit (Vazyme #EQ111) 试剂进行浓度测试。

▲ 一般浓度能够达到 15 ng/ μl 左右。

2、片段分布情况：推荐使用 Agilent 2100 Bioanalyzer 进行检测

取 1 μl 纯化后的 cDNA 扩增产物使用 Agilent 2100 Bioanalyzer 和 DNA 1000 Chip 进行检测，操作说明见 Agilent DNA 1000 kit。



▲ 主峰分布在 550 bp 左右。

图 36：文库 2100 质控图

◇ 单细胞基因组建库—Illumina 平台的测序文库制备

单细胞基因组扩增产物能够达到 μg 级别，所以文库构建的方法较为灵活，如果实验室不具备机械打断条件，可以选择转座酶法建库（参见 P31），如果有机械打断设备如 Covaris，可以选择常规的 DNA 建库试剂盒。以 VAHTS™ Universal DNA Library Prep Kit for Illumina V3 (Vazyme #ND607) 为例进行片段化后的 DNA 文库构建为例进行文库构建。

快速建库流程图

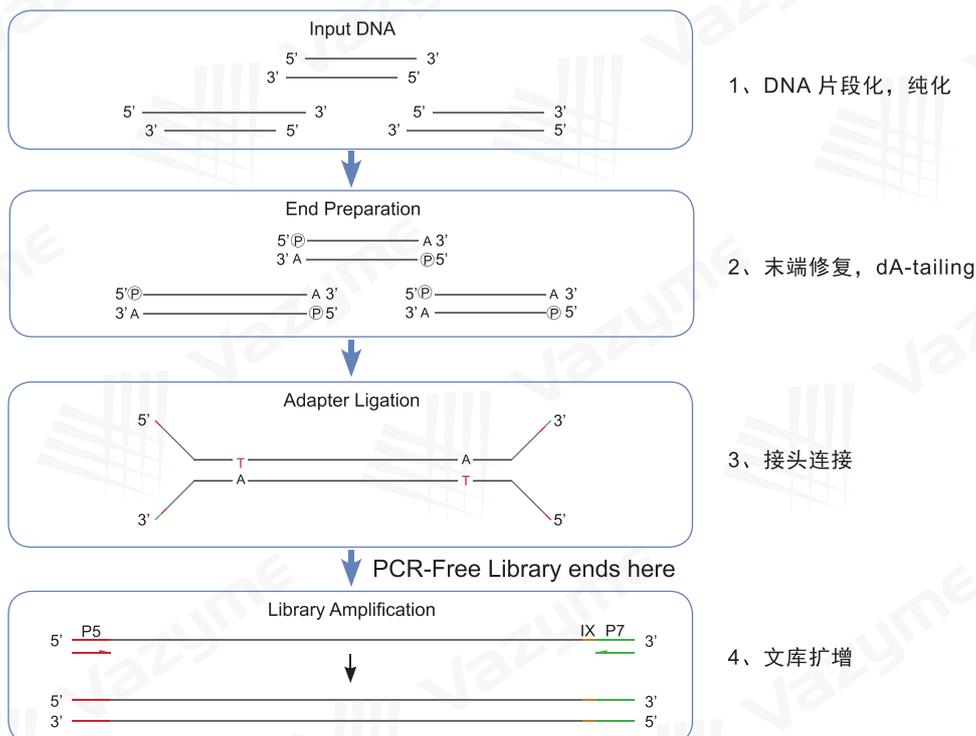


图 37：文库构建流程图

操作流程

以片段化的 0.1-1 µg DNA 起始为例进行试验

A、末端修复

1、解冻试剂

End Prep Mix 4	冰上充分溶解后轻轻混匀并离心收集后置于冰上
Rapid Ligation buffer 2	
Rapid DNA ligase	
DNA Adapter X	

2、将 End Prep Mix4 解冻后颠倒混匀，于灭菌 PCR 管中配制如下反应体系

组分	体积
Input DNA	x µl
End Prep Mix 4	15 µl
ddH ₂ O	To 65 µl

▲ 使用移液器轻轻吹打混匀，切勿震荡混匀，短暂离心将反应液收集至管底。

3、将 PCR 管置于 PCR 仪中，进行如下反应

温度	时间
热盖 105°C	On
20°C	15 min
65°C	15 min
4°C	Hold

B、接头连接

1、根据 Input DNA 将 Adapter 稀释至合适浓度

▲ Rapid Ligation buffer 2 与 Rapid DNA ligase 预混后，可于 4°C 存放不超过 24 hrs。

2、在上步反应 PCR 管中配制如下反应体系

组分	体积
End Preparation 产物	65 µl
Rapid Ligation buffer 2	25 µl
Rapid DNA ligase	5 µl
DNA Adapter X	5 µl
Total	100 µl

▲ 使用移液器轻轻吹打混匀，切勿震荡混匀，短暂离心将反应液收集至管底。

3、将 PCR 管置于 PCR 仪中，进行如下反应

温度	时间
热盖 105°C	On
20°C	15 min
4°C	Hold

▲ 当 Input DNA 量较低时，可尝试将连接时间延长一倍。但延长反应时间可能会导致 Adapter Dimer 增加，必要时需同时调整 Adapter 的使用浓度。

C、磁珠纯化

纯化方案采用 0.6 × 磁珠进行纯化，纯化步骤参考 P36

D、文库扩增

1、解冻试剂

PCR Primer Mix 3 for Illumina	冰上充分溶解后轻轻混匀并离心收集后置于冰上
VAHTS HiFi Amplification Mix	

2、将 PCR Primer Mix 3、VAHTS HiFi Amplification Mix 解冻后颠倒混匀，于灭菌 PCR 管中配制如下反应

组分	体积
纯化或分选过的 Adapter Ligation 产物	20 µl
PCR Primer Mix 3 for Illumina	5 µl
VAHTS HiFi Amplification Mix	25 µl
Total	50 µl

▲ 使用移液器轻轻吹打混匀，切勿震荡混匀，短暂离心将反应液收集至管底。

3、将 PCR 管置于 PCR 仪中，进行下述反应

组分	体积	循环数	
95°C	3 min	1	
98°C	20 sec	X	
60°C			15 sec
72°C			30 sec
72°C	5 min	1	
4°C	Hold		

▲ 100 pg - 1 µg Input DNA 扩增循环数推荐表

Input DNA (Into End Preparation)	Number of cycles required to generate	
	100 ng	1 µg
100 pg	15 - 17	16 - 19
1 ng	9 - 11	12 - 15
5 ng	7 - 9	10 - 14
10 ng	6 - 8	8 - 12
50 ng	4 - 6	7 - 10
100 ng	2 - 4	5 - 8
250 ng	1 - 3	4 - 7
500 ng	0	2 - 5
1 µg	0	2 - 5

E、文库分选

文库分选可以选择三个不同的位置进行分选，选择的方案如下，操作参考 P38

分选方案执行位置与条件	磁珠轮数	预期文库 Insert Size (bp)									
		150	200	250	300	350	400	450	500	550	700
End Preparation 之前	一轮 X (µl)	100	90	80	70	60	55	52	50	48	43
分选 (样品体积补至 100 µl)	二轮 Y (µl)	30	20	20	20	20	20	15	15	15	12
Adapter Ligation 之后	一轮 X (µl)	78	68	65	59	56	53	51	50	/	/
分选 (样品体积 100 µl)	二轮 Y (µl)	20	20	15	15	12	12	10	10	/	/
Library Amplification 之后	一轮 X (µl)	78	70	63	55	50	46	45	44	/	/
分选 (样品体积补至 100 µl)	二轮 Y (µl)	20	20	20	20	20	20	20	15	/	/

F、文库质控

1、文库产量低，推荐使用 Qubit 进行浓度测试

取 1 µl 样本使用 Qubit 仪器和 Equalbit™ dsDNA HS Assay Kit (Vazyme #EQ111) 试剂进行浓度测试。

2、片段分布情况：推荐使用 Agilent 2100 Bioanalyzer 进行检测

取 1 µl 纯化后的 cDNA 扩增产物使用 Agilent 2100 Bioanalyzer 和 DNA 1000 Chip 进行检测，操作说明见 Agilent DNA 1000 kit。

03 文库纯化和分选

◆ 磁珠结构

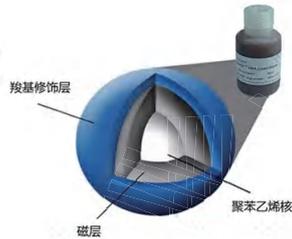


图 1：磁珠的一般结构

磁珠一般分为三层结构，最内层为支撑材料，比如聚苯乙烯做的内核；中间层为磁层，磁层通常的材料是 Fe_3O_4 ，主要作用是与磁力架上的磁铁相互吸附，从而分离核酸与反应溶液；最外层是修饰层，不同公司的最外层材料有所区别，但一般都是一些带负电的基团，比如常见的羧基材料。磁珠一般保存在 $4^{\circ}C$ 条件下，低温，如 $-20^{\circ}C$ 会破坏磁珠的结构从而导致回收效率降低。此外由于磁珠的 buffer 比较粘稠，使用前需要将磁珠上下颠倒或震荡混合后再使用。

▲ 分选磁珠的作用原理是基于一种固相载体可逆固相 (SPRI) 的分离纯化方法。磁珠可分为 DNA 磁珠和 RNA 磁珠，二者的差别在于 RNA 磁珠中含有 RNA 保护成分以防止 RNA 降解，其纯化和分选原理相同 (Vazyme)。

▲ 磁珠在使用前一定要平衡至室温且震荡均匀，目的是使磁珠中的 buffer 和 beads 均一化，否则容易造成文库纯化和分选效果的偏差。

◆ 磁珠纯化原理

在文库扩增完或者建库过程中常会遇到纯化过程，由于核酸量较少，且为了节约纯化时间，一般都是采用磁珠法纯化反应体系。核酸在磁珠 buffer 的环境下，DNA 分子会由线性压缩成球状，暴露出核酸骨架上大量的负电基团，在 buffer 体系中的阳离子连接核酸和磁珠形成“阴离子-阳离子-阴离子”的盐桥结构，使 DNA 被特异性吸附到磁珠表面。当 buffer 被去除之后，加入水性分子，会快速充分水化 DNA，解除其三者之间的离子相互作用，使得吸附到磁珠的 DNA 被纯化出来。在分选体系中，磁珠与反应体系的体积比例越高，抓取的 DNA 量就多，能抓到的片段就越小，因此，对于纯化的 DNA 片段比较小时，所加的磁珠量就要提高。

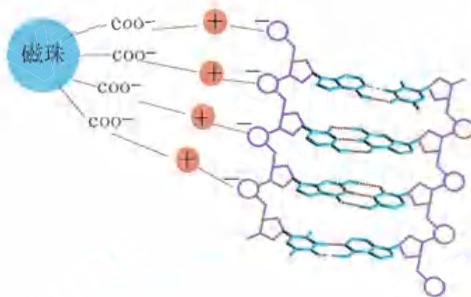


图 2：核酸与磁珠之间的盐桥结构图示

在磁珠纯化中会用到 80% 的乙醇，在这个浓度下，核酸不会溶解，用乙醇可以将体系中残留的酶和 buffer 洗一遍使得到的文库更纯。80% 的乙醇需要新配置，久置的乙醇会挥发，最终导致乙醇的有效浓度下降，这样在洗磁珠的过程中会有部分核酸溶解，导致最终的文库产量偏低。

▲ 在纯化或分选过程中常会遇到用多少乘的磁珠量这个概念，这里的乘数是指加入的磁珠与待纯化或者分选的溶液的体积比，例如需要纯化或分选的 PCR 产物体积是 $50\ \mu l$ ，加入 $50\ \mu l$ 的磁珠到体系中即为 $1\times$ 。

▲ 在纯化或分选过程中 80% 的乙醇清洗后，有一个晾干的过程，残留的乙醇可能会对后续的实验造成影响，所以需要将乙醇挥发完，但过度干燥会影响水洗脱的水化过程，使文库得率降低，可在晾干的过程中注意观察磁珠的表面，刚好晾干的磁珠状态是表面灰暗没有水光。

◆ 磁珠纯化操作过程

◇ 操作过程

- 1、磁珠平衡至室温后，涡旋振荡混匀。
- 2、吸取所需磁珠量至产物中，涡旋振荡混匀，或使用移液器轻轻吹打 10 次充分混匀。
- 3、室温孵育 5 min。
- 4、将 PCR 管短暂离心并置于磁力架中分离磁珠和液体，待溶液澄清后（约 5 min），小心移除上清。
- 5、保持 PCR 管始终置于磁力架中，加入 200 μ l 新鲜配制的 80% 乙醇漂洗磁珠，室温孵育 30 sec，小心移除上清。
- 6、重复步骤 5，总计漂洗两次。
- 7、保持 PCR 管始终置于磁力架中，开盖空气干燥磁珠 5-10 min 至无乙醇残留。
- 8、将 PCR 管从磁力架中取出，加入水或者 Buffer 进行洗脱，室温静置 5 min。
- 9、PCR 管短暂离心并置于磁力架中，待溶液澄清后，小心移取上清转移至新的 PCR 管中。

- ▲ 磁珠必须先进行室温静置 30 min 以上，使用前进行涡旋振荡混匀，否则会对抓取效率造成影响。
- ▲ 所谓磁珠的乘数，都是按照原始的样本体积进行计算，假设样本体积为 50 μ l，那么 1.8 \times ，则加入的磁珠量为 90 μ l。
- ▲ 80% 乙醇需要新鲜配制，否则有可能会影响磁珠的抓取效率。
- ▲ 磁珠晾干时一定要刚刚好，磁珠表面没有光泽，过干则会影响洗脱效率，晾干不充分会有酒精残留，影响后续实验。

◆ 磁珠分选原理

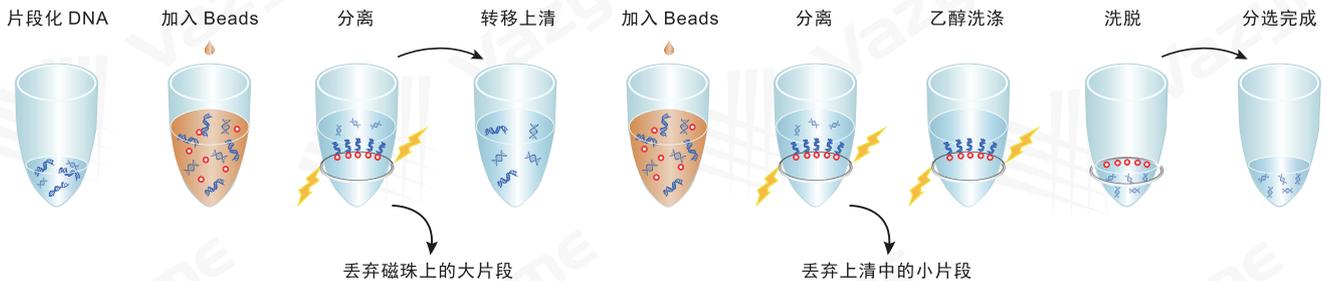


图 3：磁珠分选图示

磁珠会优先抓取较大的核酸片段，在分选过程中，是通过控制两轮磁珠的加入量来分选到所要大小的文库片段的。第一轮加入磁珠，先结合了体系中的大片段，在这一步弃磁珠，丢掉大片段，再加一轮磁珠，磁珠与余下体积中的大片段核酸结合，这一步弃上清，丢掉小片段，两轮磁珠后就抓取到了中间片段的核酸。

▲ 磁珠在分选过程中比较容易造成文库大小与理论大小有偏差，原因有以下三点：

- 1、体系在 PCR 过程中会蒸发，使得分选时实际体积比理论体积小，得到的文库也会偏小，可以在分选前将体积补齐。
- 2、枪头有磁珠挂壁或者没有完全将磁珠加入体系中，由于磁珠溶液比较粘稠，在分选过程中请使用低吸耗材，注意操作。
- 3、移液器不准，移液器日常保养中要定期校正，不准确的移液器对分选过程影响会很大。

◆ 磁珠分选操作过程

◇ 分选操作

- 1、磁珠平衡至室温后，涡旋振荡混匀。
- 2、准确量取需纯化样本的体积。
- 3、准确吸取 X 乘磁珠至产物中，涡旋震荡或者用移液器轻轻吹打混匀，室温孵育 5 min。
- 4、将反应管短暂离心并置于磁力架上，使磁珠和液体分离，待溶液澄清后（约 5 min），转移上清至新的灭菌 PCR 管中，丢弃磁珠。
- 5、涡旋振荡磁珠，并吸取 Y 乘至上清中，涡旋振荡或是用移液器轻轻吹打 10 次充分混匀，室温孵育 5 min。
- 6、将反应管短暂离心并置于磁力架上去上清，加入 200 μ l 新鲜配制的 80% 乙醇漂洗磁珠，室温孵育 30 sec，小心移除上清。
- 7、重复步骤 6，总计漂洗两次。
- 8、保持反应管始终处于磁力架上，开盖晾干，时间约为 (5-10 min)。
- 9、将反应管从磁力架去除，加上一定体积无菌水洗脱，涡旋震荡或使用移液器充分混匀，室温孵育 5 min。
- 10、将反应管短暂离心置于磁力架上，使磁珠和液体分离，待溶液澄清后（约 5 min），小心吸取一定体积上清至新的灭菌 PCR 管中， -20°C 保存。

▲ 磁珠必须先进行室温静置 30 min 以上，使用前进行涡旋振荡混匀，否则会对抓取效率造成影响。

▲ 磁珠比较粘稠，量取的磁珠体积要准确，否则可能导致分选片段的长度与预期不一致。

▲

主峰	350 bp	450 bp	550 bp
X	0.7 \times	0.6 \times	0.5 \times
Y	0.15 \times	0.15 \times	0.15 \times

▲ 分选 550 bp 主峰， R^1 为 0.5 \times ， R^2 为 0.15 \times 。
 $R^1=0.5*50=25 \mu\text{l}$ ， $R^2=0.15*50=7.5 \mu\text{l}$ 。

▲ 转移上清，弃掉磁珠，这一点跟纯化刚好相反，不要弄混。

▲ 磁珠晾干时一定要刚刚好，磁珠表面没有光泽，过干则会影响洗脱效率，晾干不充分会有酒精残留，影响后续实验。

04 常见问题及解决方案

◆ 常见问题及解决方案

◇ 植物细胞样本是否可以直接用 N711 试剂盒进行扩增？

本方案中的细胞裂解方式不能有效裂解细胞壁，带有细胞壁的真核生物细胞需要在去除细胞壁之后再行裂解，或者使用纯化后的 RNA 进行反应。

◇ 固定后的细胞是否能用 N711 试剂盒进行扩增？

经过甲醛、丙酮等方法会使组织或细胞使 RNA 的质量显著下降，N711 的扩增原理是抓取带有 poly A 的 mRNA，当 mRNA 发生断裂时，会导致扩增失败，因此 N711 不适用于固定过的细胞。

◇ PCR 扩增全长 cDNA 时，如何确定循环数？

选择最佳的循环数确保扩增仍然在扩增的指数期，如果扩增循环数增加产量不再提升，说明反应已经达到了平台期。过度扩增的 cDNA 会导致 cDNA 文库质量下降。循环数过低，会导致 cDNA 产量下降。在产量足够的前提下循环数越少越好。为了确定最佳循环数，将待测样品分别做几个平行反应，每一个反应扩增不同的循环数。比如，可以设置三个反应，一个反应按照我们推荐的循环数进行扩增，另两个反应少 2-3 个循环数或者多 2-3 个循环数（例如，100 个细胞分别用 12、10 和 8 各循环进行扩增）。

◇ 将某一功能细胞的单细胞进行转录组扩增，扩增完后进行 2100 检测，发现在特定的位置有单独的高峰，主峰还是集中在 2000 bp 左右，没有明显的降解情况。这是为什么？

因为是特定的功能细胞，所以细胞内的某个基因有可能高度表达，出现特定位置的单独高峰，有可能是因为该基因的高度表达造成的。但是最终的结果需要通过测序进行分析才能分析出是否是因为某些基因特异性表达导致的。

◇ 单细胞扩增产物，产量差距比较大，是因为 mRNA 降解引起的吗？

因为细胞存在异质性，细胞在传代的不同天数以及细胞的状态都有可能影响细胞内 mRNA 的含量，所以扩增出来的产量不同不一定是因为 mRNA 降解引起的。

◇ 扩增产物进行文库构建时，为什么选择转座酶法建库，能不能使用普通的 DNA 建库试剂盒？

可以使用普通的 DNA 建库试剂盒进行文库构建，但是要在文库构建之前加一步酶消化的过程，去掉扩增时人为加上的两端的序列。而且使用普通建库试剂盒操作起来比较繁琐。使用转座酶法建库，1、因为转座酶法进行文库构建速度快。2、不需要在添加额外的打断步骤。3、转座酶可以去掉 cDNA 扩增过程中带入的两端序列，减少数据浪费。

◇ 构建出来的文库进行 2100 检测，文库主峰偏差严重？

文库大小偏差，主要可以从以下几个方面来进行分析，1、进行分选之前，有没有将体系补足，如果没有补足有可能会有偏差。2、加入的磁珠的量是否准确。3、建库之前的起始投入量是否准确，投入量不正确，转座酶进行打断时，有可能导致片段大小有偏差，从而最终影响文库大小。

◇ 单细胞全基因组扩增没有扩增产物：

A. 样品在收集过程中丢失

重新收集样品，确定不会因操作不当，造成样品意外丢失。

B. 基因组 DNA 样本中含有抑制反应的成分

纯化或者稀释 DNA 样品。如果样品纯化过程中有乙醇沉淀或漂洗步骤，样品中残留的酒精会抑制反应，纯化过程中要让酒精充分挥发。

C. 反应温度过高

反应温度应控制在 30℃，过高的温度会使聚合酶失活，如果使用具有热盖功能的 PCR 仪进行反应，请将热盖温度设为 70℃。

◇ 单细胞全基因组扩增产生 10-40 μg DNA，但检测到部分染色体错位或等位基因丢失：

A. 对于以基因组 DNA 为起始模板的反应

基因组 DNA 存在降解。应使用完整的 DNA 或使用更多量的 DNA 做为模板。

B. 对于以细胞作为起始的反应

细胞存在凋亡或者细胞被固定过导致 DNA 降解；细胞存在难以被裂解的细胞壁（如植物细胞）不适合直接作为起始材料。

◇ 单细胞全基因组扩增阴性对照扩增产生 10-40 μg DNA，但下游检测结果为阴性（如 qPCR）：

无模板的阴性对照反应中，由引物的随机聚合延伸产生的高分子量 DNA 产物，这种产物不影响目的产物的质量及下游分析。

◇ TruePrep™ 试剂盒是否包含打断步骤？

包含。TruePrep™ 试剂盒采用新型的转座酶法进行 DNA 片段化，将繁琐的 DNA 片段化、末端修复和接头连接反应等步骤变为一步简单的酶促反应，显著缩短了实验耗时。

◇ TruePrep™ 系列试剂盒利用转座酶打断 DNA 是否存在偏好性？

转座酶打断时存在一定的偏好性，但测试表明其并不影响测序结果及数据分析。

◇ 使用 TD501/502/503 构建 DNA 文库时，55° C 反应 10 min 后可否不用磁珠纯化或 TS 溶液终止反应，而直接进行 PCR 文库扩增？

请按照说明书流程进行纯化或终止反应，否则片段化反应不能有效终止，可能导致最终的文库总长度与预期相比偏小、文库质量较差等。

◇ TruePrep™ 系列能提供多少 index 组合？

最多提供 384 种 index 组合。其中 TruePrep™ Index Kit V2 for Illumina® (Vazyme #TD202) 包含 8 种 N5XX 和 12 种 N7XX，可提供 96 种 index 组合；TruePrep™ Index Kit V3 for Illumina® (Vazyme #TD203) 包含 16 种 N6XX 以及 24 种 N8XX，可提供 384 种 index 组合。

05 参考文献

◆ 参考文献 · 关联产品

- Wu J, Xu J, Liu B, et al. Chromatin analysis in human early development reveals epigenetic transition during ZGA[J]. *Nature*, 2018; 1. IF:41.577 【Vazyme #TD502】
- Cao S, Yu S, Li D, et al. Chromatin accessibility dynamics during chemical induction of pluripotency[J]. *Cell stem cell*, 2018, 22(4): 529-542. e5. IF: 23.290 【Vazyme #ND102/NQ101】
- Huang X, Yang S, Gong J, et al. Genomic architecture of heterosis for yield traits in rice.[J]. *Nature*, 2016, 537(7622):629-633.. IF:41.577 【Vazyme #TD501】
- Wu J, Huang B, Chen H, et al. The landscape of accessible chromatin in mammalian preimplantation embryos.[J]. *Nature*, 2016, 534(7609):652. IF: 41.577【Vazyme #TD501】
- Zheng C, Zheng L, Yoo J K, et al. Landscape of Infiltrating T Cells in Liver Cancer Revealed by Single-Cell Sequencing[J]. *Cell*, 2017, 169(7):1342. IF: 30.41【Vazyme #TD503】
- Li X, Meng D, Chen S, et al. Single nucleus sequencing reveals spermatid chromosome fragmentation as a possible cause of maize haploid induction[J]. *Nature Communications*, 2017, 8(1):991. IF: 12.124 【Vazyme #TD501/503】
- Han X P, Wang R Y, Zhou Y C, et al. Mapping the Mouse Cell Atlas by Microwell-Seq[J]. *Cell*, 2018, 172(5):1091. IF: 31.398 【Vazyme #TD513/ P515】
- Jin C, Luo T, Fu Z, et al. Chronic exposure of mice to low doses of imazalil induces hepatotoxicity at the physiological, biochemical, and transcriptomic levels[J]. *Environmental toxicology*, 2018, 33(6): 650-658. IF: 2.491 【Vazyme #NR601】
- Qin X, Liu S, Lu Q, et al. Heterotrimeric G Stimulatory Protein α Subunit Is Required for Intestinal Smooth Muscle Contraction in Mice.[J]. *Gastroenterology*, 2017, 152(5):1114. IF: 18.187 【Vazyme #NR601】
- Shen C, Wang J, Shi X, et al. Transcriptome Analysis of Differentially Expressed Genes Induced by Low and High Potassium Levels Provides Insight into Fruit Sugar Metabolism of Pear[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2017, 8:938. IF: 4.298 【Vazyme #NR601/qPCR】
- Song L, Ma Q, Zou Z, et al. Molecular Link between Leaf Coloration and Gene Expression of Flavonoid and Carotenoid Biosynthesis in *Camellia sinensis* Cultivar 'Huangjinya'[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2017, 8. IF: 4.298 【Vazyme #NR602】
- He YM, Li X, Perego M, et al. Transitory presence of myeloid-derived suppressor cells in neonates is critical for control of inflammation. *Nature medicine*. 2018.01.15. IF: 32.621 【Vazyme #NR603】
- Yang L, Wang W H, Qiu W L, et al. A single-cell transcriptomic analysis reveals precise pathways and regulatory mechanisms underlying hepatoblast differentiation.[J]. *Hepatology*, 2017, 66(5):1387. IF: 14.079 【Vazyme #N411/TD502】
- Li D W, Liu J, Yang X J, et al. Chromatin Accessibility Dynamics during iPSC Reprogramming[J]. *Cell Stem Cell*, 2017, 21(6):819. IF: 23.29 【Vazyme #NQ101/ND102】
- Zhou Z, Yang X, He J, et al. Kdm2b Regulates Somatic Reprogramming through Variant PRC1 Complex-Dependent Function.[J]. *Cell Reports*, 2017, 21(8):2160-2170. IF: 8.282 【Vazyme #NQ101/ND102】
- Zhang M Y, Dong Y, Hu F X, et al. Transcription factor Hoxb5 reprograms B cells into functional T lymphocytes[J]. *Nature Immunology*, 2018, 19(2). IF: 21.809【Vazyme #ND604,N601】
- Zhang Q, Hu H, Liu H, et al. RNA sequencing enables systematic identification of platelet transcriptomic alterations in NSCLC patients[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2018, 105:204-214. IF: 3.457 【Vazyme #N711/TD503】

06 明星产品

◆ TruePrep™ DNA Library Prep Kit V2 for Illumina (Vazyme #TD501/502/503)

基于转座酶 (Tn5) 的超快速 DNA 文库制备试剂盒

流程极简

一步酶促反应替代繁琐的 DNA 片段化、末端修复、末端加 A 和接头连接步骤，降低了起始模板的投入量并缩短了文库构建时间

应用广泛

适用于常规基因组测序、单细胞转录组测序、表观遗传测序 (如 ATAC-seq 等) 以及其他前沿研究应用



◆ VAHTS™ Universal DNA Library Prep Kit for Illumina V3 (Vazyme #ND607)

通用型 DNA 文库制备试剂盒

操作简便

优化的末修 buffer，高效整合末修，5' 磷酸化和 3' 加 A 一步完成，提高文库转化率，简化流程

文库产出量高

全新优化的扩增酶和 buffer，实现扩增平台期和扩增灵敏度的双提升，提高文库产出



◆ VAHTS™ AmpSeq Library Prep Kit V2 (Vazyme #NA201)

扩增子靶向测序制备试剂盒

超多重 PCR 扩增技术

在超多重 PCR 的基础上引入扩增子末端引物消化技术，实现在单管内完成多重扩增、引物消化、接头连接等多步反应，同时兼容 Ion Torrent 和 Illumina 测序平台

极高的 On-Target Rate

On-Target 比例均高于 95%，且多次实验结果的一致性良好



◆ VAHTS™ Stranded mRNA-seq Library Prep Kit for Illumina V2 (Vazyme #NR612)

链特异性转录组文库制备试剂盒

物种适应性广

适用于人、动物、植物、真菌等真核生物

文库大小控制精准

基于温度和控制时间的控制提供 4 种片段打断方案以及基于磁珠用量提供的 4 种文库分选方案



06 明星产品

◆ VAHTS™ Small RNA Library Prep Kit for Illumina (Vazyme #NR801)

小 RNA 文库制备试剂盒

样本兼容类型广

动、植物细胞 / 组织总 RNA，分离纯化的 Small RNA，以及其他类型 RNA，如外泌体 RNA 均可作为起始模板

文库丰度高

接头污染少，有效文库比例高，miRNA 比例高、覆盖种类多，文库数据质量可靠



◆ Discover-sc® WTA Kit (Vazyme #N711)

单细胞全转录组扩增试剂盒

全长 cDNA 扩增产物

利用 Discover-sc Reverse Transcriptase 的 Template-switching 活性，获取全长的 cDNA，保留整个 mRNA 信息，从而避免了 5' 或 3' 端的偏好性

扩增灵敏度高

使用 LNA 技术及精心优化的反应体系，大幅度增加了低表达基因的检出量



◆ VAHTS™ HiFi Amplification Mix (Vazyme #N616)

重新打造的新型高保真 PCR 扩增预混液

高保真度

扩增错配率仅是 Taq DNA Polymerase 的 1/52，是 Pfu DNA Polymerase 的 1/6，有效保障了文库扩增的真实性

高扩增效率

极大提高扩增平台期和灵敏度



◆ VAHTS™ DNA Clean Beads (Vazyme #N411)

高通量测序建库首选磁珠

集纯化与分选于一体

基于 SPRI (Solid Phase Reverse Immobilization) 原理，适合于高通量测序文库构建中 DNA 纯化与片段大小分选

无缝替代 AMPure XP Beads

使用方式相同，无需要做任何改变



Vazyme Online

了解更多产品和服务信息，请登录我们的网站 www.vazyme.com



南京诺唯赞生物科技有限公司

销售咨询: sales@vazyme.com

技术支持: support@vazyme.com

技术服务: service@vazyme.com

电话: 400-600-9335

网址: www.vazyme.com

地址: 江苏省南京经济技术开发区科创路红枫科技园 C2 栋

