

青岛百创智能制造技术有限公司

## BMKMANU DG1000 GEM Kit User Guide V3



时空产品部

2023.6.14

## 版本历史

**说明书版本:** V1

**试剂盒版本:** V1

修订时间: 2021 年 12 月

修订内容: 首次发布

---

**说明书版本:** V2

**试剂盒版本:** V2

修订时间: 2022 年 9 月

修订内容:

- 1.更新 BMKMANU DG1000 GEM Kit 试剂盒中 TSO 的组分体积&上样量体积。
  - 2.更新 BMKMANU DG1000 GEM Kit 试剂盒中 RT Enzyme A 的组分体积&上样量体积。
- 

**说明书版本:** V3

**试剂盒版本:** V3

修订时间: 2023 年 6 月

修订内容:

1. 将“五.设备仪器”与“六.自备试剂&耗材&仪器”内容合并。
2. 更新 TSO 存储于 BMKMANU DG1000-3'gel beads Kit 中。
3. 制备细胞 Mix 时, 将 Nuclease-free H<sub>2</sub>O 修改成细胞(核)重悬液。
4. 将 Partitioning Oil 加样体积 220μl, 修改成 230μl。
5. 优化破油步骤。
6. 更改“4.cDNA 扩增”步骤中的反应温度&反应时间&扩增循环数。
7. 新增内容:
  - (1) 新增制备单细胞(核)悬液的具体指标。
  - (2) 新增各操作步骤注意事项。
  - (3) 新增 cDNA 浓度范围, 以及 cDNA 片段大小质控要求。

## 目录

一. 产品概述 .....	1
二. 产品组分 .....	1
三. 运输与保存条件 .....	2
四. 适用范围 .....	2
五. 自备试剂&耗材&仪器 .....	2
六. 注意事项 .....	3
七. 实验流程概要 .....	3
八. 操作步骤 .....	4
1.制备单细胞悬液 .....	4
2.形成油包水(GEMs)及反转录 .....	4
3. cDNA 纯化 .....	8
4.cDNA 扩增 .....	10
5.PCR 产物纯化 .....	11
6.cDNA 定量及质控 .....	11

## 一. 产品概述

百创智造单细胞转录组试剂盒是针对单细胞转录组 3'端测序而定向开发的专用试剂盒，用于在单个细胞水平上对其携带的遗传信息进行测序，具有细胞通量高、捕获周期短等优势。试剂盒包含 BMKMANU DG1000 GEM Kit、BMKMANU DG1000 CleanUp Kit 及配套试剂。本试剂盒所使用的酶和缓冲液已经通过严格质量控制及功能验证，最大程度上保证了结果的稳定性和可重复性。

## 二. 产品组分

### 1. BMKMANU DG1000 GEM Kit (百创 DG1000 GEM 形成试剂盒)

编号	组分	4 rxns
1	RT Buffer	64μl
2	dNTP	12.8μl
3	Reducing Agent	23.2μl
4	TSO	在 BMKMANU DG1000-3'gel beads Kit 中
5	RT Enzyme A	34.8μl
6	RT Enzyme B	8μl
7	cDNA Primers	8μl
8	Amp Mix	100μl

### 2. BMKMANU DG1000 Cleanup Kit (百创 DG1000 纯化试剂盒)

编号	组分	4 rxns
1	Cleanup buffer A	516μl
2	Cleanup buffer B	240μl
3	Reducing Agent	在 BMKMANU DG1000 GEM Kit 中
4	Dynabeads	24μl
5	Partitioning Oil	920μl
6	Recovery Agent	400μl

### 3. BMKMANU DG1000-3'gel beads Kit (百创 DG1000 3'胶珠)

编号	组分	4 rxns
1	BMKMANUDG1000-3'gel beads	35μl*4
4	TSO	8μl

### 4. BMKMANU C1000 Chip Kit (百创 C1000 GEM 生成芯片)

编号	组分	4 rxns
1	BMKMANU C1000 Chip	2*2 个

## 三. 运输与保存条件

编号	试剂盒名称	保存方式	运输方式
1	BMKMANU DG1000 GEM Kit	-20°C保存	干冰运输
2	BMKMANU DG1000 Cleanup Kit	2~8°C保存	冰袋运输
3	BMKMANU DG1000-3'gel beads Kit	-80°C保存	干冰运输
4	BMKMANU C1000 Chip Kit	室温保存	室温运输

## 四. 适用范围

适用于 BMKMANU DG1000 3'单细胞转录组文库。

物种：人、鼠、部分植物等物种。

组织类型：细胞直径≤60μm 的各种组织。

## 五. 自备试剂&耗材&仪器

### 试剂：

无核酸酶水 (Nuclease-free H<sub>2</sub>O)、甘油、无水乙醇、SPRI select (BECKMAN B23317)、细胞活性及细胞浓度检测试剂、Qubit dsDNA HS 分析试剂盒等。

**耗材：**

无酶 PCR 管、一次性无菌&低吸附枪头、低吸附 1.5ml 离心管、不同量程移液枪等。

**仪器：**

百创 DG1000 微液滴生成仪、深孔 PCR 热循环仪、百创转录组磁力分离器（或其他等效磁力架）、涡旋振荡仪、迷你离心机、细胞计数仪(可选)、4°C 离心机(可选)、Agilent Technologies 2100 Bioanalyzer（或其他等效仪器）、Qubit 荧光定量仪等。

## 六. 注意事项

1. 细胞样品准备：组织样本需解离为单个细胞，细胞活性≥85%、结团率<15%、细胞浓度应为 700-1200 cells/μl。
2. BMKMANU DG1000-3' gel beads 在-80°C保存，使用前需平衡至室温。
3. 向芯片中加样时应保持操作环境、操作台及实验工具洁净，减少空气流通。
4. 80%乙醇溶液建议现配现用，配制时间不超过 12h。

## 七. 实验流程概要

编号	步骤		时间
1	制备单细胞悬浮液	组织解离	根据不同细胞类型自定
2	形成油包水及反转录	配置细胞相 Mix	5min
		形成油包水（GEMs）	3min
		GEMs-RT 孵育	95min
3	cDNA 纯化	GEMs 破油&cDNA 纯化	30min
4	cDNA 扩增	PCR 扩增	60min
5	PCR 产物纯化	PCR 产物纯化	30min
6	定量与质控	浓度&片段大小检测	55min

## 八. 操作步骤

### 1. 制备单细胞悬液

单细胞转录组实验成功的关键，是制备活性高、完整性好、结团率低的单细胞悬液。可根据不同组织类型进行单细胞（核）悬液处理，若是新鲜组织样本，可制备单细胞/细胞核悬液；若是冰冻组织样本，建议提取细胞核。具体指标如下：

单细胞悬液		细胞核悬液	
指标内容	指标范围	指标内容	指标范围
活细胞浓度 <sup>a</sup>	700~1200 cells/μl	细胞核浓度	700~1200 cells/μl
细胞活率 <sup>b</sup>	≥85%	细胞活率	≤5%
细胞直径 <sup>c</sup>	≤60μm	核膜完整性	≥80%
结团率 <sup>d</sup>	<15%	结团率	<15%
体积	≥100μl	体积	≥100μl
其他 <sup>e</sup>	少碎片；不存在逆转录抑制剂和非细胞的核酸分子等。	其他	细胞核总数≥5 <sup>10</sup> 5个、少碎片；不存在逆转录抑制剂和非细胞的核酸分子等。

#### 【注意】：

a.上机形成油包水（GEMs）过程中，活细胞/细胞核悬液浓度建议在 700~1200 cells/μl 之间。

b.细胞活率必须满足 85%及以上，最好≥95%。若细胞活性很低（比如≤65%），建议先使用死细胞去除试剂盒将细胞活性提高到上机水平，再进行后续 GEMs 操作。若细胞活性接近 85%（例如~80%），可以考虑风险上机。

c.建议上机的最大细胞直径不超过 60μm。

d.细胞结团率越小，双胞率越低。

e.部分植物样本也可上机。一般需要将植物组织制备成原生质体，或者提取植物组织的细胞核，再进行后续的 GEMs 形成反应。

### 2. 形成油包水(GEMs)及反转录

#### 实验前准备

（1）提前将 BMKMANU DG1000 GEM Kit 试剂盒中的组分（包括 TSO），放在冰上解冻。

(2) **BMKMANU DG1000-3' gel beads** 需提前拿出，室温孵育 15min。

## 2.1 配置 RT Mix

按照以下体系配置 **RT Mix**，涡旋混匀后瞬时离心。若为多个样品，按照 1.1 倍体系配制。

GEM Kit	组分	1 rxn
1	RT Buffer	16μl
2	dNTP	3.2μl
3	Reducing Agent	0.8μl
4	TSO	2μl
5	RT Enzyme A	8.7μl
6	RT Enzyme B	2μl

### 【注意】：

a.试剂在使用前，先充分融化再涡旋混匀（酶组分除外）。在配置和使用过程中，将所有酶和预混液放在冰上，用完试剂后放回到建议的存储位置。

b.配置好 RT Mix 后，请及时将 TSO 放入-80℃保存。

## 2.2 制备细胞 Mix

目前百创 DG1000 微液滴仪器的捕获细胞效率是 50~70%，客户可根据要检测的细胞量及细胞浓度配置细胞 Mix 体系。一般建议捕获的细胞数在 1w 以下。

细胞 Mix	组分	1 rxn
1	细胞液	X μl
2	细胞（核）重悬液	(47.3-X) μl

### 【注意】：

a.配置细胞 Mix 应在冰上进行，保证细胞活性。配置好的细胞 Mix，用移液枪轻轻吹吸混匀，不可涡旋震荡。

b.例如：想要捕获 5000 个细胞，按照 50%捕获效率计算，那么需要上样的细胞数量  $\approx 5000/0.5=10000$  个。

## 2.3 制备细胞相

将上述的细胞 Mix 溶液全部加入 RT Mix 中，用移液枪轻轻吹匀，此时混合好的溶液即为细胞相。



## 2.4 芯片加样&形成 GEMs

(1) 首先，取上述 **75 $\mu$ l 细胞相**加入相应孔中（图 1），加样时枪头靠近底部缓慢加入细胞相溶液，避免产生气泡。

(2) 其次，将室温孵育好的 **DG1000-3' gel beads**（胶珠）瞬时离心，缓慢吹吸混匀 **15~20 次**（避免产生气泡）。立即取 **35 $\mu$ l gel beads** 缓慢加入到相应孔中，避免产生气泡（图 1）。

(3) 最后，加入 **230 $\mu$ l Partitioning Oil**（在 BMKMANUDG1000 Cleanup Kit 中）于相应孔中（图 1）。



图 1：百创 C1000 芯片加样顺序

### 【注意】：

- 加样顺序依次为：**细胞相、DG1000-3' gel beads、Partitioning Oil**，不可随意颠倒顺序。
- 一定要保证 **DG1000-3' gel beads** 恢复到室温后，才能加入到芯片中。且加入之前用移液枪**缓慢吹吸**，保证胶珠充分混匀。
- 加入到芯片的胶珠相、细胞相、油相，均不要有气泡产生，否则会导致 **GEMs** 制备失败。若有气泡产生，需要用枪头将气泡移除。
- 加样时，以与液体上升相同的速度提高移液枪枪头，保持枪头略微浸没在液体中，这样操作可以避免气泡产生。
- 如果芯片有一侧的通道未使用，建议**所有孔（收集池、胶珠相、细胞相、油相孔）**中都加入 **80 $\mu$ l 50%甘油溶液**（室温）。同时注意不可用其他的试剂代替 **50%甘油溶液**。

(4) 加样完成后，将芯片放入仪器中，确保垫片孔与芯片孔对齐，避免用手接触垫片，关闭仪器盖子。打开仪器开关，点击开始按钮，仪器运行 110s 后即可形成 GEMs。

**【注意】：**

a. 放置芯片时请注意芯片“BMKMANU”字样为正向。

b. 芯片应时刻保持水平状态，避免溶液溅出。

## 2.5 转移 GEMs

(1) 仪器运行结束后，及时打开仪器盖子。

(2) 取下芯片，检查细胞相和胶珠相的对应孔中是否有残余的试剂，若没有或少量（大约 10~15 $\mu$ l）进入步骤（3）。**若发现其中一个或两个孔残余较多的溶液，需要重新进行上机。**

(3) 此时观察收集池中有两层液体，上层：白色乳浊液（GEMs 层，如下图 2 所示），下层：清澈透明液体（油相，弃掉）。用移液枪缓慢吸取上层乳浊液（GEMs 层），枪头紧贴 PCR 管的侧壁，缓慢将 GEMs 注入 PCR 管底部，进行后续逆转录反应。

**【注意】：**

a. 用移液枪缓慢吸出上层乳浊液于 PCR 管，避免引入气泡对“油包水”结构产生破坏，PCR 管底部可以保留少量（5~10 $\mu$ l）下层液体。

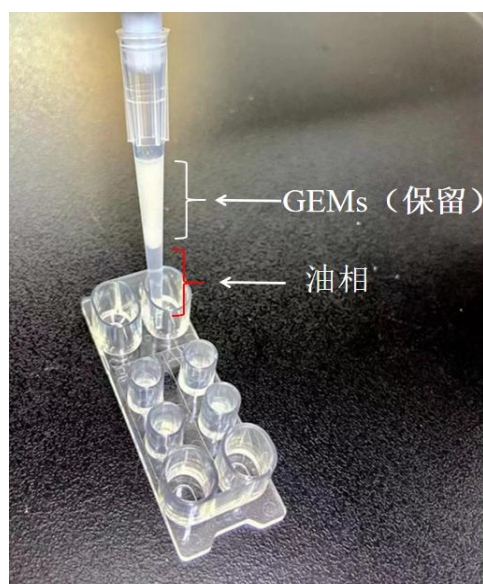


图 2：上层：GEMs；下层：油相。

## 2.6 逆转录

将上述装有油包水（GEMs）的 PCR 管放入 PCR 仪器中进行逆转录反应。逆转录程序如下：

热盖	反应体系	所需时间
85°C	120 $\mu$ l	~95min
步骤	温度	时间
a	42°C	90min
b	85°C	5min
c	4°C	Hold

### 【注意】：

a.若无深孔 PCR 仪，从芯片中吸取油包水时，可将其缓慢分装在 2 个 PCR 管中。（切勿吹吸混匀）。

逆转录结束后，继续进行下一步。RT 产物也可在 4°C 最多保存 72h，或在-20°C 下最多保存一周。

## 3. cDNA 纯化

### 实验前准备

- （1）配置 80%乙醇溶液，建议现配现用，配制时间不超过 12 h。
- （2）提前将 BMKMANU DG1000 Cleanup Kit 试剂盒各组分充分涡旋混匀，并放在冰上保存。

### 3.1 破油

- （1）逆转录结束后取出 PCR 管，瞬时离心。
- （2）室温下向每个 PCR 管中，贴壁缓慢加入 100  $\mu$ l Recovery Agent，请勿用移液枪或涡旋混匀，室温下静置 2min。
- （3）2min 后油包水溶解，此时溶液分两层，用移液枪将下层液体（油相）尽可能全部吸弃，保留上层透明溶液（RT 产物）于 PCR 管中，如图 3 所示。

### 【注意】：

a.若 2min 后发现有未完全溶解的油包水，需要盖上管盖，缓慢颠倒 2-3 次，瞬时离心。用移液枪将下层液体吸弃，保留上层透明溶液于 PCR 管中。

b.若有少量难以吸取的下层液体，可适当保留不超过 10 $\mu$ l。

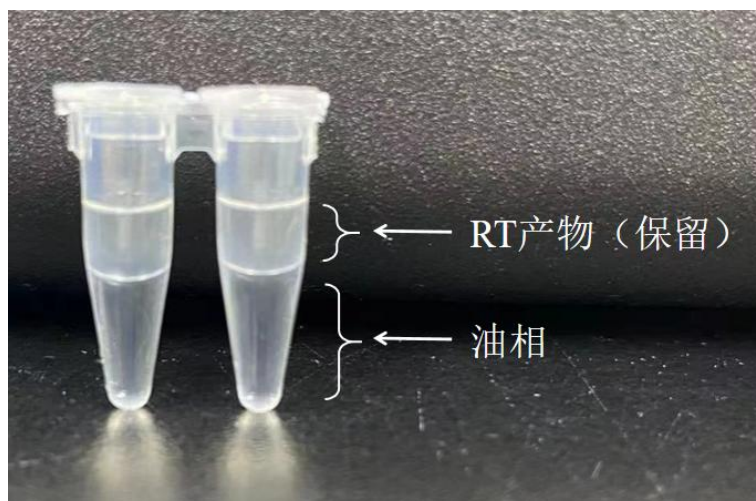


图 3: 破油后的 RT 产物。

### 3.2 cDNA 纯化

(1) 按照下表配置**纯化 Mix**（总体积：194 $\mu$ l），涡旋混匀并短暂离心。若为多个样本，按照 1.1 倍配置 Mix（Mix 中不包含 Dynabeads）。

Cleanup Kit	组分	1 rxn
1	Cleanup buffer A	129 $\mu$ l
2	Cleanup buffer B	60 $\mu$ l
3	Reducing Agent	5 $\mu$ l

(2) 向每个样品中（RT 产物）加入 194 $\mu$ l 的**纯化 Mix**。

(3) 充分涡旋混匀 Dynabeads，然后向每个样品中加入 6 $\mu$ l 的 Dynabeads。

#### 【注意】：

a.使用前必须充分混匀 Dynabeads，若发现有结块可用移液枪吹吸混匀。

(4) 用移液枪缓慢吹吸混匀 15 次（移液枪设置为 200 $\mu$ l），室温下静置孵育 5min。

(5) 重复步骤（4）。

(6) 将 PCR 管放置于磁力架上（HIGH 面向上）~2min，待液体澄清后，**弃去上清液**，在此操作过程中请勿触碰磁珠。

(7) 在磁力架上，向 PCR 管中加入 300 $\mu$ l 80%乙醇溶液（**现配现用**），静置 30s，弃去乙醇溶液。

(8) 再次向 PCR 管中加入 200 $\mu$ l 80%乙醇溶液，静置 30s，弃去乙醇溶液。

(9) 盖上 PCR 管管盖，瞬时离心后，将 PCR 管置于磁力架上（LOW 面向上），用 10 $\mu$ l 枪头吸弃残留的乙醇溶液。

(10) 开盖室温干燥 1min 后，立即加入 23.5 $\mu$ l Nuclease-free H<sub>2</sub>O（可用 EB 溶液替换）。

(11) 从磁力架上取下 PCR 管，用移液枪吹吸混匀 15 次（移液枪设置为 20 $\mu$ l），室温下静置孵育 5min。

(12) 瞬时离心后，将 PCR 管重新放置于磁力架上（LOW 面向上）~2min，直至溶液澄清。

(13) 将 23 $\mu$ l 上清液（RT 纯化产物）转移到新的 PCR 管中，并进入下一步操作。

#### 4. cDNA 扩增

(1) 在冰上配置 **cDNA 扩增 Mix**，涡旋震荡并离心。若为多个样品，按照 1.1 倍体系配制。配置如下：

GEM Kit	组分	1 rxn
7	cDNA Primers	2 $\mu$ l
8	Amp Mix	25 $\mu$ l

(2) 将 27 $\mu$ l 的 **cDNA 扩增 Mix**，加入到 23 $\mu$ l RT 纯化产物中，用移液枪缓慢吹吸混匀（移液枪设置为 45 $\mu$ l）。

(3) 瞬时离心后置于 PCR 仪中，扩增程序如下：

热盖	反应体系	所需时间	
105°C	50 $\mu$ l	~45min	
步骤	温度	时间	循环
1	98°C	3min	-
2	98°C	15s	12 cycles
3	62°C	20s	
4	72°C	2min	
5	72°C	5min	-
6	4°C	Hold	-

(4) 反应结束后，直接进入步骤 5，或将 PCR 产物在 4°C 中最多保存 72h，或在 -20°C 下最多保存一周。

## 5. PCR 产物纯化

(1) SPRI 磁珠涡旋混匀后，取 30 $\mu$ l SPRI 磁珠 (0.6 $\times$ ) 加入 PCR 产物中。用移液枪缓慢吹吸混匀 15 次 (移液枪设置为 70 $\mu$ l)，室温下静置孵育 5min。

(2) 瞬时离心后，将 PCR 管放置于磁力架上 (HIGH 面向上) ~2min，待液体澄清后，**弃去上清液**，在此操作过程中请勿触碰磁珠。

(3) 在磁力架上，向 PCR 管中加入 200 $\mu$ l 80%乙醇溶液 (**现配现用**)，静置 30s，弃去乙醇溶液。

(4) 重复步骤 (3)。

(5) 盖上 PCR 管管盖，瞬时离心后，将 PCR 管放置于磁力架上 (LOW 面向上)，直至溶液澄清，用 10 $\mu$ l 枪头吸弃残留的乙醇溶液。

(6) 开盖室温干燥至磁珠表面不再光滑 (**1~2min，控制好时间，过度干燥会降低 cDNA 的洗脱效率**)，立即加入 25 $\mu$ l Nuclease-free H<sub>2</sub>O (可用 EB 溶液替换)。

(7) 从磁力架上取下 PCR 管，用移液枪吹吸混匀 15 次 (移液枪设置为 23 $\mu$ l)，室温下静置孵育 2min。

(8) 瞬时离心后，将 PCR 管重新放置于磁力架上 (LOW 面向上) ~2min，直至溶液澄清。

(9) 将 25 $\mu$ l 上清液 (PCR 纯化产物) 转移到至 1.5ml 的离心管中保存。

(10) PCR 纯化产物直接进入步骤 6，或放置于 -20 $^{\circ}$ C 下保存，不超过 1 个月。

## 6. cDNA 定量及质控

### (1) cDNA 定量

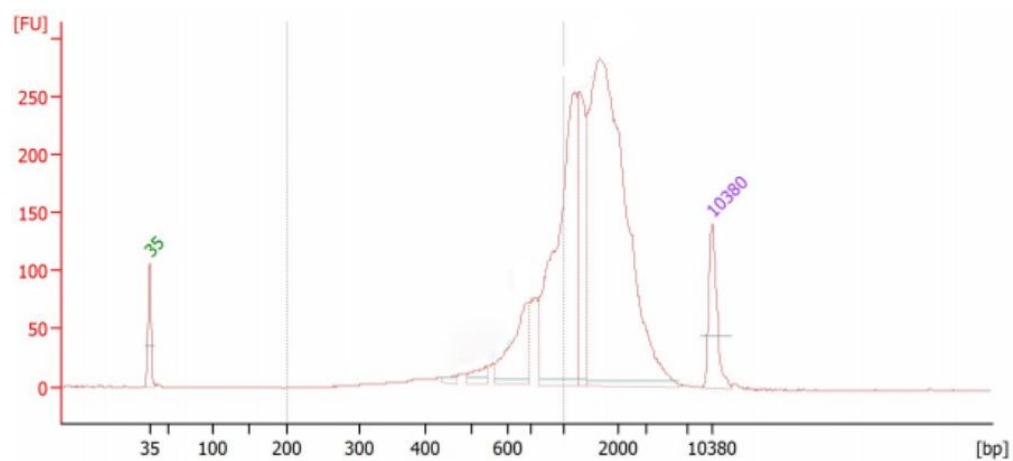
通过 Qubit 荧光定量仪和 Qubit dsDNA HS 试剂盒进行定量检测，建议每次进行定量检测前，重新进行标准曲线的标定。一般要求 cDNA 浓度大于 1.5ng/ $\mu$ L。

#### 【注意】：

a.cDNA 浓度检测时，必须基于染料法 (例如：Qubit 荧光定量仪) 进行定量分析，不可基于吸光值法 (例如：Nanodrop 仪器) 来计算核酸浓度。

### (2) cDNA 片段质控

使用 High sensitivity Agilent Technologies 2100/5300 Bioanalyzerd 仪器/Labchip GX 核酸片段分析仪对 cDNA 峰型进行检测。cDNA 产物 2100 质检图例：



**cDNA 质控要求：** 片段长度为 200-9000bp； 35-100bp 有片段不影响建库； 主峰集中在 1000-2000bp。