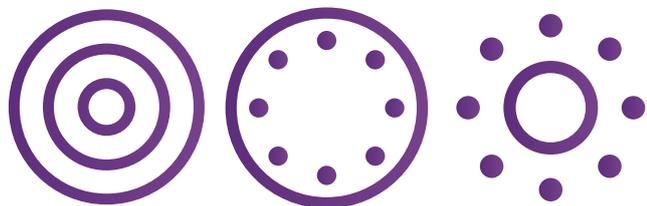


# 时空蛋白转录组 Stereo-CITE V1.1 建库实验操作说明书



货号：101KL160 (16 RXNs)

试剂盒版本号：V1.0

文档编号：STOG03009

说明书版本号：A

# 版本历史

说明书版本： A  
试剂盒版本： V 1.0  
修订日期： 2025 年 3 月  
描述： 首次发布

提示：请下载最新版说明书，与相应版本的试剂盒使用。

©法律声明。

2025 深圳华大三箭齐发科技有限责任公司保留所有权利。

1. 本产品仅用于研究，不用于诊断。
2. 本手册上的内容可能全部或部分受到适用的知识产权法的保护。深圳华大三箭齐发科技有限责任公司和/或相应权利主体依法拥有其知识产权，包括但不限于商标权、版权等。
3. 深圳华大三箭齐发科技有限责任公司不授予或暗示使用我们或任何第三方的任何版权 内容或商标（注册或未注册）的权利或许可。未经本单位书面同意，任何人不得擅自使用、修改、复制、公开传播、更改、分发或发布本手册的程序或内容，不得使用或利用设计技巧使用或占有本单位或本单位关联方的商标、标识或其他专有信息（包括图像、文本、网页设计或形式）。
4. 此处的任何内容都无意于或应被理解为对此处列出或描述的任何产品的性能的任何保证、表达或暗示。适用于本文所列任何产品的任何和所有保证均载于购买该产品所附的适用销售条款和条件。深圳华大三箭齐发科技有限责任公司不做任何保证，并在此声明对本文所述任何第三方产品或协议的使用不做任何保证。

# 目录



## 第一章 产品介绍

1.1. 产品描述	2
1.2. 测序指南	2
1.3. 产品组成	2
1.4. 需自备物料清单	4
1.5. 注意事项	6

## 第二章 时空转录组文库和抗体衍生标签(ADT)文库制备

2.1. 时空转录组文库制备	8
2.1.1. 实验前准备	8
2.1.2. cDNA多重置换扩增与ssDNA纯化	8
2.1.3. PCR产物双选	10
2.2. 抗体衍生标签(ADT)文库制备	12
2.2.1. 实验前准备	12
2.2.2. ADT扩增	12
2.2.3. ADT扩增产物纯化	13

## 第三章 时空转录组和ADT文库结构和测序

3.1. 时空转录组文库与ADT文库共同测序	16
3.1.1. 适配测序仪	16
3.1.2. 文库测序类型	16
3.2. 时空转录组文库和ADT文库单独测序	17
3.2.1. 适配测序仪	17
3.2.2. 文库测序类型	17

## 附录

附录A PCR Barcode Primer Mix 使用规则	18
附录B Qubit ssDNA Assay Kit 检测浓度操作	20



提示：额外的操作提示和指导。



关键步骤：特别注意这些步骤，以避免实验失败或不好的结果。



质量检查点



注意：特别注意；操作不当或疏忽可能导致实验失败。



停止点：您可以在这里暂停实验并存储样品。

# 01

## 产品介绍



## 1.1. 产品描述

本操作说明书适配于**Stereo-seq 16 Barcode建库试剂盒**。

Stereo-seq 16 Barcode 建库试剂盒是针对时空转录组FF(Fresh Frozen, FF) cDNA 样本、FFPE(Formalin-FixedParaffin-Embedded,FFPE)cDNA样本、多蛋白抗体衍生标签(ADT)样本实现添加样本 Barcode 和构建文库，适用于多样本混合测序，最多可支持 16 个样本混合测序。试剂盒经过严格的质量控制和功能验证，最大程度上保证了文库构建的稳定性和重复性，以及测序数据拆分的均一性和准确性。

## 1.2. 测序指南

使用本产品构建的测序文库可使用DNBSEQ测序平台进行测序。**详情请参考本手册第三章。**

## 1.3. 产品组成

Stereo-seq 16 Barcode建库试剂盒



\*关于产品货号、试剂组分等信息见表格1-1。

收到产品后：

- 请尽快将产品按照指定条件保存。若转移时间较长，建议使用控温容器运输。
- 若发现冷链箱温度异常，可要求物流方现场打印温度实时监控记录表；签收后也可联系当地科研合作代表，以查询相关记录。
- 当运输条件、储存条件及使用方式都正确时，所有组分在有效期内均能保持完整活性。

表格1-1 Stereo-seq 16 Barcode建库试剂盒的组分信息

试剂盒种类	组分信息	货号	管盖颜色	规格及数量
Stereo-seq 16 Barcode 建库试剂盒 货号: 101KL160	KMB	1000047709	○ 白色	
	KME	1000047770	○ 白色	
	PCR Barcode Primer Mix1	1000043201	● 红色	
	PCR Barcode Primer Mix2	1000043202	● 红色	
	PCR Barcode Primer Mix3	1000043203	● 红色	
	PCR Barcode Primer Mix4	1000043204	● 红色	
	PCR Barcode Primer Mix5	1000043205	● 橙色	
	PCR Barcode Primer Mix6	1000043206	● 橙色	
	PCR Barcode Primer Mix7	1000043207	● 橙色	
	PCR Barcode Primer Mix8	1000043208	● 橙色	
	PCR Barcode Primer Mix9	1000043209	● 黄色	
	PCR Barcode Primer Mix10	1000043210	● 黄色	
	PCR Barcode Primer Mix11	1000043211	● 黄色	
	PCR Barcode Primer Mix12	1000043212	● 黄色	
	PCR Barcode Primer Mix13	1000043213	● 绿色	
	PCR Barcode Primer Mix14	1000043214	● 绿色	
	PCR Barcode Primer Mix15	1000043215	● 绿色	
PCR Barcode Primer Mix16	1000043216	● 绿色		
	PCR Amplification Mix	1000043217	● 黑色	

 储存温度: -25°C ~ -15°C
 运输温度: -25°C ~ -15°C
 有效期: 见标签



PCR Barcode Primer Mix使用规则请参考附录A。

## 1.4. 需自备物料清单

本实验所需的设备和物料见下方表格，也可参考 [《时空蛋白转录组Stereo-CITE V1.1生化流程第三方物料需求表》](#)，不包括标准实验室设备，如制冰机、生物安全柜、pH 计、冰箱等。

表格 1-2 自备物料清单

仪器		
品牌	仪器	货号
Thermo Fisher Scientific <sup>1</sup>	PCR仪 *	4483636
Bio-Rad <sup>1</sup>	PCR仪 *	1861096
其林贝尔 <sup>2</sup>	小型离心机	LX-200B
莫纳 <sup>2</sup>	小型离心机	IG0331
其林贝尔	漩涡混匀仪	QL-901
Thermo Fisher Scientific <sup>3</sup>	荧光定量仪 *	Q33216
Thermo Fisher Scientific <sup>3</sup>	荧光定量仪 *	Q33238
Eppendorf <sup>4</sup>	移液器	5种量程为一套
Rainin <sup>4</sup>	移液器	5种量程为一套
Thermo Fisher Scientific	磁力架(2.0 mL)	12321D
NEB <sup>5</sup>	磁力架(0.2 mL)	S1515S
Invitrogen <sup>5</sup>	磁力架(0.2 mL)	492025
Agilent <sup>6</sup>	生物分析仪	G2939AA
Agilent <sup>6</sup>	生物分析仪	G2992AA



从含有相同序号上标的品牌中任选其一，含有\*上标的仪器除推荐品牌货号，不建议更换其他品牌货号。

试剂		
品牌	试剂	货号
Ambion <sup>1</sup>	Nuclease free water	AM9937
Invitrogen <sup>1</sup>	Nuclease free water	2186768
西陇化工 <sup>2</sup>	无水乙醇（分析纯）	32061
SIGMA <sup>2</sup>	无水乙醇（分析纯）	E7023
Invitrogen	Qubit ssDNA Assay Kit *	Q10212
Invitrogen	Qubit dsDNA HS Assay Kit *	Q32854
Agilent <sup>3</sup>	安捷伦高灵敏度DNA分析试剂盒 *	5067-4626
Agilent <sup>3</sup>	安捷伦高灵敏度DNA分析试剂盒 *	5067-1506
Ambion <sup>4</sup>	TE Buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.1 mM EDTA)	AM9858
VWR <sup>4</sup>	TE Buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.1 mM EDTA)	E112-500ML
Agencourt <sup>5</sup>	磁珠 *	A63882
Beckman Coulter <sup>5</sup>	磁珠 *	B23317/B23318/B23319
Vazyme <sup>5</sup>	磁珠 *	N411-01/N411-02/N411-03



从含有相同序号上标的品牌中任选其一，含有\*上标的试剂除推荐品牌货号，不建议更换其他品牌货号。

耗材		
品牌	耗材	货号
Invitrogen	Qubit Assay Tubes *	Q32856
Axygen	1.5 mL 离心管	MCT-150-A
Axygen <sup>1</sup>	0.2 mL PCR管	PCR-02-C
Axygen <sup>1</sup>	PCR 八联管	PCR-0208-CP-C
Axygen	10 μL盒装带滤芯灭菌短吸头	TXLF-10-L-R-S
Axygen	100 μL盒装带滤芯灭菌吸头	TF-100-R-S
Axygen	200 μL盒装带滤芯灭菌吸头	TF-200-L-R-S
Axygen	1000 μL盒装带滤芯灭菌吸头	TF-1000-L-R-S



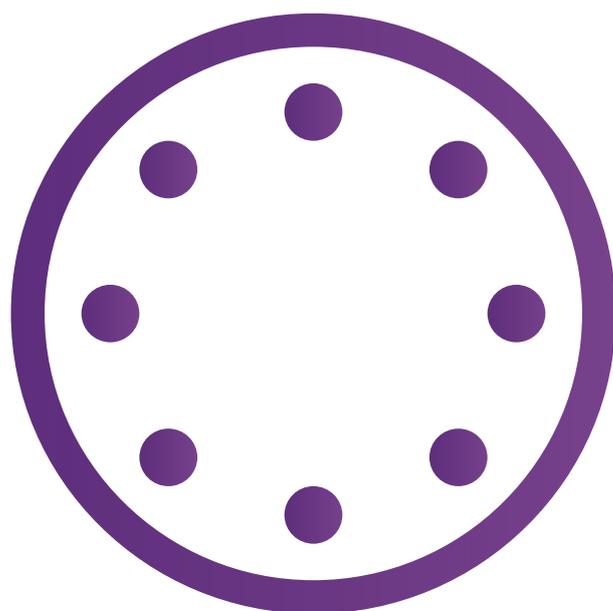
从含有相同序号上标的品牌中任选其一，含有\*上标的耗材除推荐品牌货号，不建议更换其他品牌货号。

## 1.5. 注意事项

- 本产品仅适用于科研用途，不可用于临床诊断，使用前请仔细阅读本说明书。
- 实验前请熟悉需使用的各种仪器的注意事项并掌握其操作方法。
- 本说明书提供的实验流程是通用的，实际操作中可根据具体的实验设计、样本特征、测序应用和设备进行实验流程、反应参数的调整，以优化性能和效率。
- 推荐使用前将各试剂组分提前取出，将酶类组分瞬时离心后置于冰上备用，并将其他组分置于室温解冻。解冻后轻柔地上下颠倒数次使其充分混匀，瞬时离心后置于冰上备用。
- 为避免样本交叉污染，推荐使用带滤芯的吸头，吸取不同样本时请更换吸头。
- 推荐把 PCR 仪温度预热至反应温度。
- 应避免皮肤和眼睛直接接触样本及试剂，切勿吞咽样本及试剂，一旦发生意外请立即用大量清水冲洗并及时就医。
- 所有样本和各种废弃物均应按相关法规规定处理。

# 02

## 时空转录组文库和抗体衍生标签 (ADT)文库制备



## 2.1. 时空转录组文库制备

### 2.1.1. 实验前准备



 本实验用于稀释试剂的液体，除特殊说明外，均使用 **Nuclease-Free Water**。

准备试剂	准备流程	暂存条件
KMB	提前 5 min 放于冰盒解冻	冰上备用
80% 乙醇	无水乙醇稀释到 80%	室温 1 d
磁珠	提前取出平衡至室温	室温 6 hr

### 2.1.2. cDNA多重置换扩增与ssDNA纯化

a. 取 100 ng cDNA 产物用于后续扩增反应；如果 cDNA 产量不足 100 ng 可以投入最大体积 35  $\mu$ L 进行建库尝试；

b. 按照表格 2-1 冰上配置扩增 Mix 体系，轻轻吹打混匀后瞬时离心；

表格2-1 扩增Mix

组分	单个反应体积
KMB	10 $\mu$ L
cDNA 产物 (100 ng)	X $\mu$ L
Nuclease-Free Water	35-X $\mu$ L
<b>Total</b>	<b>45 <math>\mu</math>L</b>



 cDNA产物投入量： $X(\mu\text{L}) = 100 \text{ (ng)} / \text{cDNA 浓度 (ng}/\mu\text{L})$

c. 准备 PCR 仪，将反应管放入 PCR 仪参照表格2-2条件进行反应；

表格 2-2 反应条件

温度	时间
105 °C (热盖)	on
95 °C	5 min
40 °C	3 min
4 °C	$\infty$

d.当 PCR 仪达到 4 °C 后取出 PCR 管，迷你离心机离心 **5 s** 后，加入 5  $\mu$ L KME，反应 Mix 用漩涡振荡器轻微振荡混匀，迷你离心机离心 **5 s**，即刻置于 PCR 仪中进行反应，反应条件如下；

表格 2-3 反应条件

温度	时间
105 °C (热盖)	on
37 °C	10 min
12 °C	$\infty$

e. 对上述反应产物进行 0.8X 磁珠纯化；

 请确保磁珠在使用前已复温 30 min。

- 1) 产物 (50  $\mu$ L) 与室温平衡好的磁珠按照 1:0.8 混合，振荡混匀，室温孵育 **10 min**；
- 2) 瞬时离心后，将 PCR 管放在磁力架上静置 **3-5 min**，待液体澄清后去除上清；
- 3) 加 200  $\mu$ L 80%乙醇漂洗，应使用新鲜配制的 80%乙醇。漂洗过程中离心管应始终置于磁力架中，移液器吸头应在远离磁力架的管壁上操作，请勿吸打、搅动磁珠。将离心管保持在磁力架上静置 **30 s**；
- 4) 弃上清，重复步骤 3)；
- 5) 弃上清，室温晾干 **5-8 min**，直至磁珠表面无反光、无开裂；
- 6) 加 27  $\mu$ L 的 TE Buffer 回溶，振荡混匀后室温静置 **5 min**，瞬时离心，磁力架静置 **3-5 min**，待液体澄清后回收上清，将回溶产物转移到新的 1.5mL 离心管中。

 请勿丢弃上清！

 **QC** 取 2  $\mu$ L 回溶产物，使用 Qubit ssDNA Assay Kit 检测浓度并记录，浓度通常为不低于 5 ng/ $\mu$ L。

 Qubit ssDNA Assay Kit 检测浓度操作详见附录 B，此步骤是实验关键。

 **停止点：**纯化产物可在 -20° C 下保存 1 个月。

f. 纯化产物扩增：取上述纯化产物 25  $\mu$ L 进行扩增。按照表格 2-4 配制 PCR Mix 体系；

表格 2-4 PCR Mix

组分	单个反应体积
上一步纯化产物	25 $\mu$ L
PCR Amplification Mix	50 $\mu$ L
PCR Barcode Primer Mix	25 $\mu$ L
<b>Total</b>	<b>100 <math>\mu</math>L</b>

 **注意：**PCR Barcode Primer Mix 使用规则详见附录 A。



g. PCR Mix振荡混匀，瞬时离心后置于 PCR 仪中，参照如下反应程序进行扩增；

表格 2-5 PCR 扩增程序 (反应体系 100  $\mu$ L)

温度	时间	循环数
105 °C 热盖	on	-
95 °C	5 min	1
98 °C	20 s	
58 °C	20 s	13
72 °C	30 s	
72 °C	5 min	1
12 °C	$\infty$	-

h. 取 1  $\mu$ L PCR 产物，用 Qubit dsDNA HS Kit 检测浓度并记录。

 浓度通常高于 5 ng/ $\mu$ L。



### 2.1.3. PCR 产物双选

a. 将上述 PCR 产物和室温平衡好的磁珠按照 1: 0.55 混合 (100  $\mu$ L PCR 产物、55  $\mu$ L 磁珠)，振荡混匀后室温孵育 **5 min**；

b. 将上述反应 PCR 管瞬时离心后置于磁力架上，静置 **3 min**，液体澄清后将上清转移到新的 PCR 管；

 注意保留上清。

c. 加 15  $\mu$ L 磁珠与上清混合，振荡混匀，室温孵育 **5 min**；

d. 将离心管瞬时离心后置于磁力架上，静置 **3-5 min**，至液体澄清后用移液器小心吸取上清并弃掉；

e. 将离心管保持在磁力架上，加入 200  $\mu$ L 新鲜配制的 80%乙醇，通过旋转磁力架上的离心管来漂洗磁珠。静置 **30 s**，小心吸取并丢弃上清；

f. 重复一次步骤 e；

g. 尽量吸干管内液体。若有少量液体残留在管壁，可将离心管瞬时离心，在磁力架上分离后，用小量程的移液器将管底液体吸干；

h. 室温下静置 **3-5 min** 风干磁珠，直至磁珠表面无反光、无开裂；

i. 加 20  $\mu$ L 的 TE Buffer 进行回溶，振荡混匀后室温静置 **5 min**，瞬时离心后置于磁力架上静置 **3 min**，待液体澄清后将上清转移到 1.5 mL 离心管内；

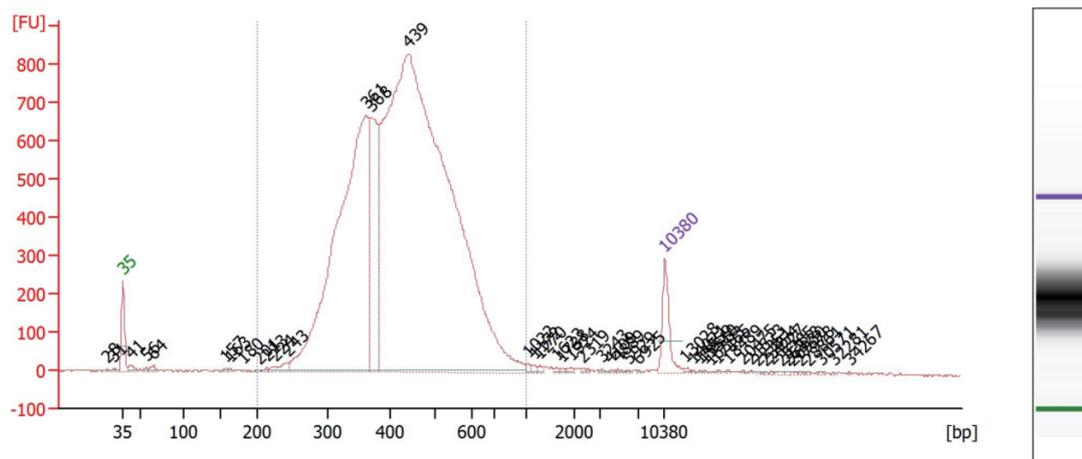
 注意保留上清。



j. 取1 μL片筛产物，先用 Qubit dsDNA HS Kit 检测浓度并记录，再通过 Bioanalyzer、Tapestation (Agilent Technologies)、LabChip® GX、GXII、GX Touch(PerkinElmer)、Fragment Analyzer™ (Advanced Analytical)等基于电泳分离原理的设备对 PCR 扩增产物进行片段分布检测。



**QC** 要求片段分布在 200-600 bp (如图一)，纯化后产量通常大于100 ng。



图一 . PCR 扩增产物 2100 峰图



**—** 停止点：PCR产物可在-20℃下长期保存。

## 2.2. 抗体衍生标签(ADT)文库制备

### 2.2.1. 实验前准备



 本实验用于稀释试剂的液体，除特殊说明外，均使用 **Nuclease-Free Water**。

准备试剂	准备流程	暂存条件
80% 乙醇	无水乙醇稀释到 80%	室温 1 d
磁珠	提前取出平衡至室温	室温 6 hr

### 2.2.2. ADT扩增

- 取20 ng ADT产物；
- 按照表格2-6配制ADT扩增PCR Mix体系；

表格2-6 ADT扩增PCR Mix

组分	单个反应体积
ADT文库纯化产物 (20ng)	X $\mu$ L
Nuclease-Free Water	25-X $\mu$ L
PCR Barcode Primer Mix	25 $\mu$ L
PCR Amplification Mix	50 $\mu$ L
<b>Total</b>	<b>100 <math>\mu</math>L</b>

 PCR Barcode Primer Mix使用规则请参考附录A，当时空转录组文库与ADT文库共同测序时，必须使用不同的Sample Barcode。

- 振荡混匀，瞬时离心后置于PCR仪中，参照如下反应程序进行扩增。

表格 2-7 ADT扩增PCR程序

温度	时间	循环数
105°C 热盖	on	-
95°C	5 min	1
98°C	20 s	8
58°C	20 s	
72°C	1 min	1
72°C	5 min	
12°C	$\infty$	-

d. 取1  $\mu\text{L}$  PCR产物，用Qubit dsDNA HS Kit检测浓度并记录。



**QC** 浓度通常高于10 ng/ $\mu\text{L}$ 。

### 2.2.3. ADT扩增产物纯化

#### 对ADT文库扩增产物进行 2 X磁珠纯化

a. 将PCR产物（终体积 ~100  $\mu\text{L}$ ）至1.5mL离心管，再与室温平衡好的磁珠按照1:2混合，振荡混匀，室温孵育**10 min**；

b. 瞬时离心后，将PCR管放在磁力架上静置**3-5 min**，待液体澄清后去除上清；



**...** 注意去掉上清，保留磁珠。

c. 将离心管保持在磁力架上，加入400  $\mu\text{L}$  80%乙醇漂洗（新鲜配制并平衡至室温的80%乙醇）。通过旋转磁力架上的离心管来漂洗磁珠。静置**30 s**，小心吸取并丢弃上清。移液器吸头应在远离磁力架的管壁上操作，请勿吸打、搅动磁珠；

d. 重复一次步骤c；

e. 尽量吸干管内液体。若有少量液体残留在管壁，可将离心管瞬时离心，在磁力架上分离后，用小量程的移液器将管底液体吸干；

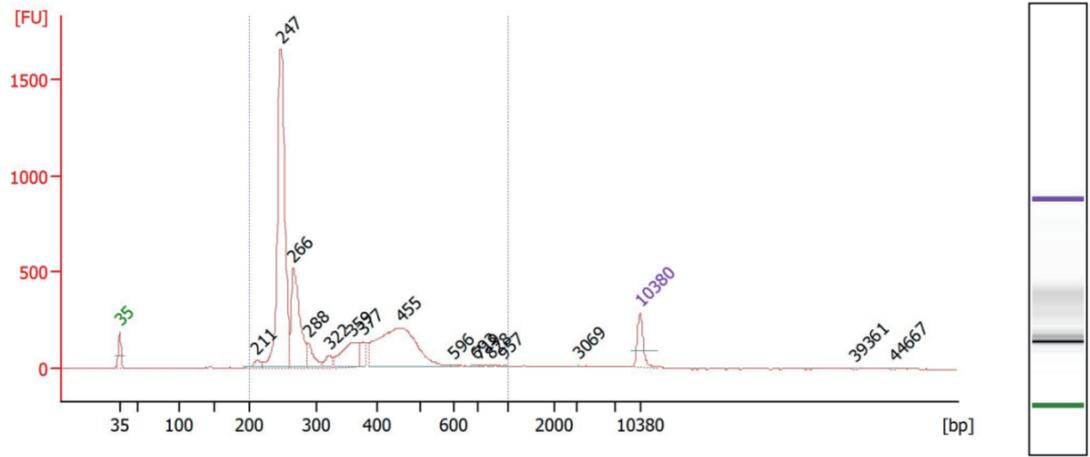
f. 将离心管保持在磁力架上，打开盖子，室温风干**5-8 min**，直至磁珠表面无反光、无开裂；

g. 加100  $\mu\text{L}$ 的TE buffer回溶，振荡混匀后室温静置**5 min**，瞬时离心，磁力架静置**3-5 min**，待液体澄清后将上清（~98  $\mu\text{L}$ ）转移到新的1.5 mL离心管中。

**...** 注意保留上清。

h. 取1  $\mu\text{L}$  ADT文库纯化产物样品，先用 Qubit dsDNA HS Kit 检测浓度并记录，通过 Bioanalyzer、Tapestation (Agilent Technologies)、LabChip<sup>®</sup> GX、GXII、GX Touch(Perkin-Elmer)、Fragment Analyzer<sup>™</sup> (Advanced Analytical)等基于电泳分离原理的设备对文库片段分布进行检测。

**QC** 要求片段主要分布在200-260bp（如图二），纯化后产量通常大于100 ng。



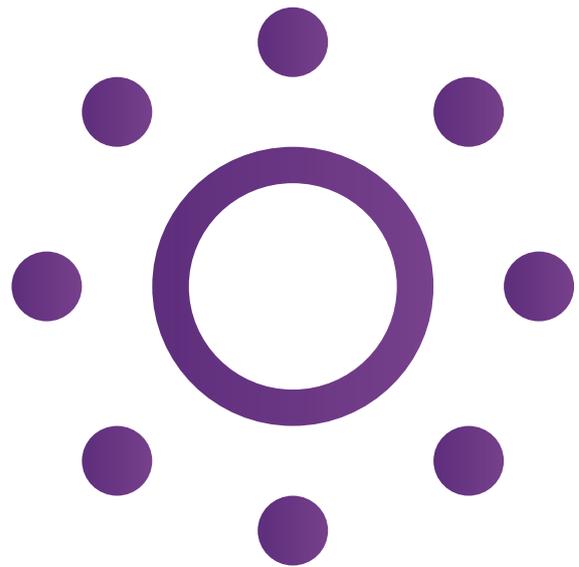
图二 . ADT扩增产物 2100 峰图



— 停止点：PCR产物可在-20℃下长期保存。

# 03

## 时空转录组和ADT文库 结构和测序



Stereo-CITE的时空转录组文库和ADT文库既可以共同测序，也可以单独测序。本章介绍了 Stereo-CITE的时空转录组文库和ADT文库兼容的测序仪器和测序策略。

### 3.1. 时空转录组文库与ADT文库共同测序

#### 3.1.1. 适配测序仪

DNBSEQ-T7

#### 当在DNBSEQ-T7RS 测序时：

- 建议将时空转录组文库和ADT文库加载到同一flowcell。
- 建议制备完 DNB，测量 DNB 浓度，根据样本所需的数据量和DNB浓度计算各样本的 DNB pooling体积，进行DNB pooling。具体可参考《DNBSEQ-T7RS 时空可视化试剂套装 (T7 STO FCL PE75) V4.0 货号：940-001895-00》说明书，4.5 测定 DNB 浓度及 pooling部分。

为了保证测序碱基平衡，建议将带有不同sample barcode的时空转录组与ADT文库，按照转录组文库和ADT文库质量比不低于1: 1 进行 DNB pooling，即转录组文库投入质量高于ADT文库。

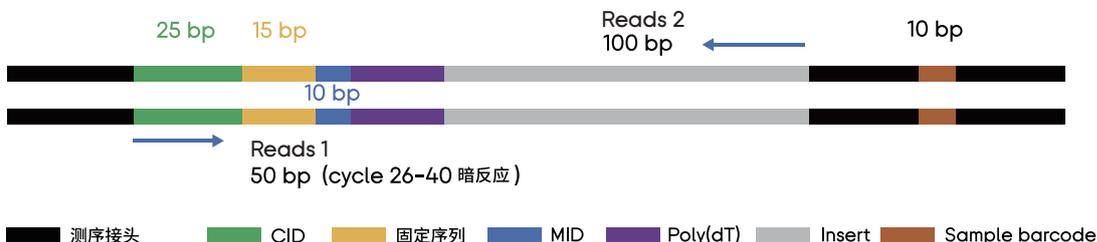
#### 3.1.2. 文库测序类型

时空转录组文库和ADT文库共同测序的测序策略（如图三，图四所示）：

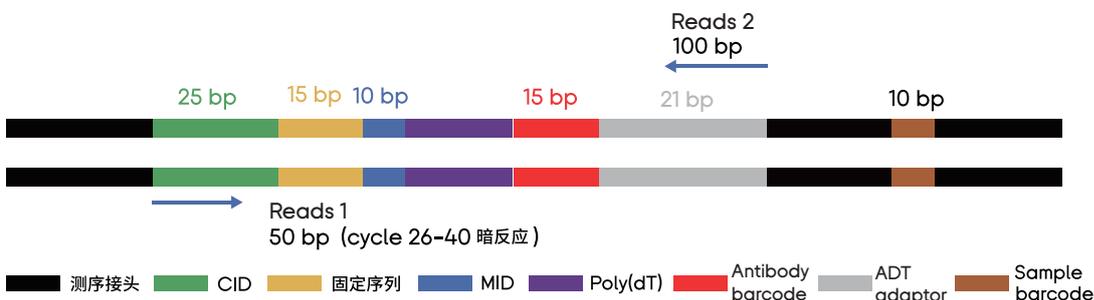
50 (read1) + 100 (read2) +10 (Sample Barcode)



一链暗反应：26-40



图三. 转录组文库测序策略（当与ADT文库在T7共同测序时）



图四. ADT文库测序策略（当与转录组文库在T7共同测序时）



时空转录组文库与ADT文库共同测序适配的 SAW 分析流程的入参为：

```
--kit-version="Stereo-CITE T FF V1.1"
--sequencing-type="PE75_50+100"
```

请参考试剂盒《DNBSEQ-T7RS 时空可视化试剂套装 (T7 STO FCL PE75) V4.0 货号：940-001895-00》说明书制备 DNB 测序。测序前请仔细阅读对应的说明书，并严格按照说明书的内容进行操作。如有任何测序疑问，请您随时联系当地的华大智造客户经理或技术支持。

### 3.2. 时空转录组文库和ADT文库单独测序

#### 3.2.1. 适配测序仪

MGISEQ-2000

当在MGISEQ-2000RS测序时：

- 建议制备完DNB后，将转录组文库和ADT文库加载到不同flowcell测序，不建议将转录组文库和ADT文库加载到同一flowcell中测序。

#### 3.2.2. 文库测序类型

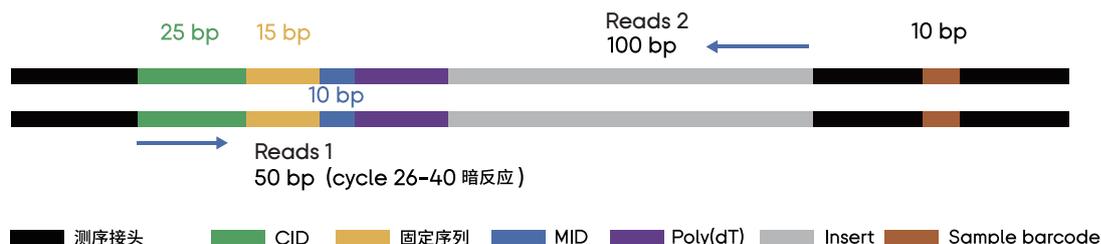
时空转录组文库和ADT文库测序策略（当在2000单独测序时）：

转录组文库测序策略（如图五所示）：

50 (read1) + 100 (read2) + 10 (Sample Barcode)



一链暗反应：26-40



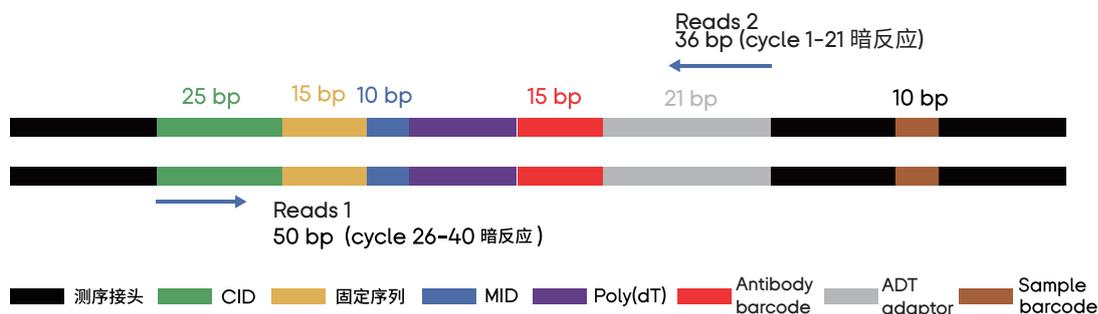
图五. 时空转录组文库测序策略（当在2000单独测序时）

ADT文库测序策略（如图六所示）：

50 (read1) + 36 (read2) + 10 (Sample Barcode)



一链暗反应：26-40；二链暗反应：1-21



图六. ADT文库结构（当在2000单独测序时）



时空转录组与ADT文库共同测序适配的 SAW 分析流程的入参为：

```
--kit-version="Stereo-CITE T FF V1.1"
--sequencing-type="PE75_50+100","PE75_50+36"
```

请参考试剂盒《MGISEQ-2000RS时空可视化试剂套装（G400 STO FCL PE75）货号：940-001887-00》说明书制备 DNB 测序。测序前请仔细阅读对应的说明书，并严格按照说明书的内容进行操作。如有任何测序疑问，请您随时联系当地的华大智造客户经理或技术支持。

## 附录

### 附录A PCR Barcode Primer Mix 使用规则



Stereo-seq 16 Barcode 扩增试剂盒V1.0可提供 16 种 PCR Barcode Primer Mix，为满足大量样本批量化建库、多样本混合测序而研发。本试剂盒基于碱基平衡的设计原则，经过反复实验测试，挑选了最佳的 Barcode 组合，为保证最佳效果，使用时请仔细阅读下方使用规则。

**Barcode 碱基序列相同，不能在同一条 lane 中测序。**

基于碱基平衡的设计原则，在使用时需将PCR Barcode Primer Mix成组使用，试剂盒中包含的PCR Barcode Primer Mix具备如下的分组规则：

4个PCR Barcode Primer Mix成组：1~4、5~8、9~12、13~16，共计4组。

#### PCR Barcode Primer Mix使用规则

**PCR Barcode Primer Mix 使用前必须先离心将液体聚集于管底，轻柔地揭开管盖，防止液体飞溅，避免交叉污染；使用时需用移液器吸打混匀液体并瞬时离心；使用完毕后需及时盖好管盖。**

**不同PCR Barcode Primer Mix混合方法：取等体积混合成Mix后加入样本中。**

#### 当每个样本数据量要求相同时

不同样本数目可参考下表所示的推荐 Barcode组合方案。

PCR Barcode Primer Mix 使用规则参考

文库数/lane	方法 1	方法 2	方法 3	方法 4
1	1~4	5~8	9~12	13~16
2	文库 1: 1~2	文库 1: 5~6	文库 1: 9~10	文库 1: 13~14
	文库 2: 3~4	文库 2: 7~8	文库 2: 11~12	文库 2: 15~16
3	文库 1: 1	文库 1: 5	文库 1: 9	文库 1: 13
	文库 2: 2	文库 2: 6	文库 2: 10	文库 2: 14
	文库 3: 3~4	文库 3: 7~8	文库 3: 11~12	文库 3: 15~16
4	文库 1: 1	文库 1: 5	文库 1: 9	文库 1: 13
	文库 2: 2	文库 2: 6	文库 2: 10	文库 2: 14
	文库 3: 3	文库 3: 7	文库 3: 11	文库 3: 15
	文库 4: 4	文库 4: 8	文库 4: 12	文库 4: 16
5	文库 1: 1	文库 1: 5	文库 1: 9	文库 1: 13
	文库 2: 2	文库 2: 6	文库 2: 10	文库 2: 14
	文库 3: 3	文库 3: 7	文库 3: 11	文库 3: 15
	文库 4: 4	文库 4: 8	文库 4: 12	文库 4: 16
	文库 5: 任选其余三组中一组	文库 5: 任选其余三组中一组	文库 5: 任选其余三组中一组	文库 5: 任选其余三组中一组

文库数/lane	方法 1	方法 2	方法 3	方法 4
6	文库 1: 1	文库 1: 5	文库 1: 9	文库 1: 13
	文库 2: 2	文库 2: 6	文库 2: 10	文库 2: 14
	文库 3: 3	文库 3: 7	文库 3: 11	文库 3: 15
	文库 4: 4	文库 4: 8	文库 4: 12	文库 4: 16
	文库 任选其余三组中 5-6: 两组	文库 任选其余三组中 5-6: 两组	文库 任选其余三组中 5-6: 两组	文库 任选其余三组中 5-6: 两组
7	文库 1: 1	文库 1: 5	文库 1: 9	文库 1: 13
	文库 2: 2	文库 2: 6	文库 2: 10	文库 2: 14
	文库 3: 3	文库 3: 7	文库 3: 11	文库 3: 15
	文库 4: 4	文库 4: 8	文库 4: 12	文库 4: 16
	文库 参照 3 文库数/lane 5-7: 选择组合 (避开 1-4)	文库 参照 3 文库数/lane 5-7: 选择组合 (避开 5-8)	文库 参照 3 文库数/lane 5-7: 选择组合 (避开 9-12)	文库 参照 3 文库数/lane 5-7: 选择组合 (避开 13-16)
8	4 个 PCR Barcode Primer Mix 成对组合中任选两组			
8n+x (n=1, x=1-8, 总计 9-16 个)	分两步操作: 1. 文库 1-8分成1组, 采用上述8 文库数/lane方法添加 PCR Barcode Primer Mix。 2. 剩余文库分成1组, 根据 x 的数值, 采用上述对应的 1-8 文库数/lane 方法添加 PCR Barcode Primer Mix, 并注意按照对应要求加不同组别的 PCR Barcode Primer Mix。			



**不同PCR Barcode Primer Mix 混合示例:**

**示例一, 2 文库数/lane( 参考方法1) 操作方法:**

1. 分别取12.5 μL PCR Barcode Primer Mix 1 和2, 等体积混合成Mix 后加入到文库1 中;
2. 再分别取12.5 μL PCR Barcode Primer Mix 3 和4, 等体积混合成Mix 后加入到文库2 中。

**示例二, 13 文库数/lane 操作方法:**

1. 取25 μL PCR Barcode Primer Mix 1 加入文库1 中, 取25 μL PCR Barcode Primer Mix 2 加入文库2 中, ……., 取25 μL PCR Barcode Primer Mix 12 加入文库12 中;
2. 再分别取6.25 μL PCR Barcode Primer Mix 13、14、15 和16, 等体积混合成Mix 后加入到文库13 中。

**当文库数据量要求不相同**

需遵循在一条 lane 中数据量要求大于 20%的文库需使用成组的 PCR Barcode Primer Mix。



示例: 有9个文库 pooling 于一条 lane 中, 其中有 1 个文库要求数据量为 30%, 此时需采用如下方案: 如其他8个文库分别使用PCR Barcode Primer Mix 1~8, 则这一个文库不可使用单一PCR Barcode Primer Mix, 而是要使用不重复且成组的PCR Barcode Primer Mix 9~12或13~16。

## 附录B Qubit ssDNA Assay Kit 检测浓度操作



**!** Working Solution 配制后需在**30 min**内使用。

禁止碰触检测管的锥形管壁。

检测管中不能有气泡。

操作步骤如下：

a. 配制 Qubit Working Solution;

1) 混匀 Qubit ssDNA Buffer 与 Qubit ssDNA Reagent，在避光管里以 199: 1 的比例混合。

2) 漩涡振荡混匀后使用迷你离心机短暂离心 **5 s**，常温放置待用。

- 每个样本 ssDNA定量需要配置 200  $\mu\text{L}$  Qubit Working Solution
- 建立标准曲线另需 2 个 200  $\mu\text{L}$  Qubit Working Solution

b. 准备 2+N 个 Qubit 检测管，分别标注 S1 (Qubit ssDNA standard#1 0ng/ $\mu\text{L}$ )、S2 (Qubit ssDNA standard#2 20ng/ $\mu\text{L}$ )、D1 (待测样本 ssDNA)、D2 (待测样本 ssDNA)、D3 (待测样本 ssDNA) 等；

c. 按照下表准备标准管及待测样本管：

	S1 ( $\mu\text{L}$ )	S2 ( $\mu\text{L}$ )	D1 ( $\mu\text{L}$ )	D2 ( $\mu\text{L}$ )	D3 ( $\mu\text{L}$ )
Working Solution	190	190	198	198	198
S1 (0 ng/ $\mu\text{L}$ )	10	/	/	/	/
S2 (20 ng/ $\mu\text{L}$ )	/	10	/	/	/
待测样本 ssDNA	/	/	2	2	2
总体积	200	200	200	200	200

d. 将准备好的样本管及标准液管漩涡振荡混匀，瞬时离心 **5 s**，避光孵育 **2 min**，孵育结束后，可进行下一步；

e. 按照 Qubit 使用说明书，选择 ssDNA 检测通道，分别放入标准液 S1 和标准液 S2 建立标准曲线，曲线生成后把 S2 当成样品测定 1 次。此时，样本投入量选择 10  $\mu\text{L}$ ，单位 ng/ $\mu\text{L}$ ；

- 当测定值在 19.9-20 ng/ $\mu\text{L}$  时，则认为此次的标准曲线为合格，可以用来检测样品。若不在这个范围，再次混匀后重新建立标准曲线；
- S2 在合格范围内才可使用该标准曲线；否则重新配制标准品；

f. 放入待测样本管，样品投入量选择 2  $\mu\text{L}$ ，单位 ng/ $\mu\text{L}$ ，测量并记录测量出的数值。