



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105579587 A

(43) 申请公布日 2016. 05. 11

(21) 申请号 201480053360. 6

代理人 浦彩华 姚开丽

(22) 申请日 2014. 08. 22

(51) Int. Cl.

(30) 优先权数据

C12P 19/34(2006. 01)

61/869, 220 2013. 08. 23 US

C07H 21/04(2006. 01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2016. 03. 25

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2014/052233 2014. 08. 22

(87) PCT国际申请的公布数据

W02015/027135 EN 2015. 02. 26

(71) 申请人 惠氏公司

地址 美国纽约

(72) 发明人 里卡德·桑德伯格 西莫内·佩斯里

欧麦德·R·法瑞达尼

(74) 专利代理机构 北京派特恩知识产权代理有

限公司 11270

权利要求书2页 说明书173页 附图14页

(54) 发明名称

用于使用模板转换反应进行 cDNA 合成和单细胞转录组概况分析的方法和组合物

(57) 摘要

本申请披露了用于以改善的逆转录、模板转换以及预扩增合成 cDNA 以增加由个体细胞产生的 cDNA 文库的收率和平均长度的方法。这些新方法包括将 TSO 3' 端的单个核苷酸残基换成锁核酸 (INA)、使用甲基基团供体、和 / 或高于常规所用的 MgCl₂ 浓度。结合这些差异的单细胞转录组分析具有全长覆盖度、改善的灵敏度和准确度, 具有较少偏差并且更易进行成本有效的自动化。本发明还提供了在 3' 端包含锁核酸的 cDNA 分子、包含这些 cDNA 分子的组合物和 cDNA 文库, 以及用于单细胞转录组概况分析的方法。

1. 一种用于制备与RNA分子互补的DNA的方法,该方法包括以下步骤:
使cDNA合成引物退火于所述RNA分子并且合成第一cDNA链以形成RNA-cDNA中间体;并且
通过使所述RNA-cDNA中间体与模板转换寡核苷酸(TSO)在适于与该RNA分子互补的该第一DNA链延伸的条件下接触进行逆转录反应,从而使该第一DNA链另外与该TSO互补,其中该TSO在其3'端包含锁核酸(LNA)。
2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述逆转录反应在甲基基团供体和金属盐的存在下进行。
3. 根据权利要求2所述的方法,其中所述甲基基团供体是甜菜碱。
4. 根据权利要求2所述的方法,其中所述金属盐是镁盐。
5. 根据权利要求4所述的方法,其中所述镁盐具有至少7mM、至少8mM、或至少9mM的浓度。
6. 根据权利要求1至5中任一项所述的方法,其中所述模板转换寡核苷酸包含至少一个或两个核糖核苷酸残基和所述LNA残基。
7. 根据权利要求6所述的方法,其中所述至少一个或两个核糖核苷酸残基是核糖鸟嘌呤。
8. 根据权利要求1至7中任一项所述的方法,其中所述锁核酸残基选自下组,该组由以下各项组成:锁鸟嘌呤、锁腺嘌呤、锁尿嘧啶、锁胸腺嘧啶、锁胞嘧啶、以及锁5-甲基胞嘧啶。
9. 根据权利要求1至8中任一项所述的方法,其中所述锁核酸残基是锁鸟嘌呤。
10. 根据权利要求1至9中任一项所述的方法,其中所述锁核酸残基处于3'最末端位置。
11. 根据权利要求1至10中任一项所述的方法,其中所述模板转换寡核苷酸在3'端包含由式rGrG+N表征的三个核苷酸残基,其中+N表示锁核苷酸残基。
12. 根据权利要求11所述的方法,其中所述模板转换寡核苷酸包含rGrG+G。
13. 根据权利要求2至12中任一项所述的方法,其中所述甲基基团供体是甜菜碱,并且所述金属盐是浓度为至少9mM的MgCl₂。
14. 根据权利要求1至13中任一项所述的方法,该方法进一步包括使用寡核苷酸引物扩增与所述RNA分子和所述模板转换寡核苷酸互补的所述DNA链。
15. 根据权利要求1至14中任一项所述的方法,其中所述模板转换寡核苷酸选自表S2中的这些寡核苷酸。
16. 根据权利要求1至15中任一项所述的方法,其中该cDNA是在包含锚定的oligo-dT引物的珠粒上合成的。
17. 根据权利要求16所述的方法,其中所述oligo-dT引物包含5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACT₃₀VN-3'的序列,其中"N"是任何核苷碱基,并且"V"选自下组,该组由以下各项组成:"A"、"C"以及"G"。
18. 根据权利要求13至17中任一项所述的方法,该方法进一步包括PCR预扩增、标签化、以及最终PCR扩增。
19. 根据权利要求18所述的方法,其中该PCR预扩增在未纯化从逆转录反应获得的该cDNA的情况下进行。
20. 根据权利要求1至19中任一项所述的方法,其中所述RNA是细胞中的总RNA。

21. 一种cDNA文库,该cDNA文库通过根据权利要求1至20中任一项所述的方法产生。
22. 根据权利要求21所述的cDNA文库用于单细胞转录组概况分析的用途。
23. 一种用于分析多个单细胞中的基因表达的方法,该方法包括以下步骤:根据权利要求1至20中任一项所述的方法制备cDNA文库;并且对该cDNA文库进行测序。
24. 一种模板转换寡核苷酸(TSO),该TSO在其3'端包含锁核苷酸残基。
25. 根据权利要求24所述的TSO,该TSO在3'端包含三个核苷酸残基,该三个核苷酸残基选自下组,该组由以下各项组成:+N+N+N、N+N+N、NN+N、rN+N+N、以及rNrN+N,其中N在每次出现时独立地为脱氧核糖核苷酸残基,rN在每次出现时独立地为核糖核苷酸残基,并且+N在每次出现时独立地为锁核苷酸残基。
26. 根据权利要求24或25所述的TSO,其中所述锁核苷酸残基选自下组,该组由以下各项组成:锁鸟嘌呤、锁腺嘌呤、锁尿嘧啶、锁胸腺嘧啶、锁胞嘧啶、以及锁5-甲基胞嘧啶。
27. 根据权利要求25所述的TSO,其中所述三个核苷酸残基是NN+G或rNrN+G。
28. 根据权利要求25所述的TSO,其中所述三个核苷酸残基是rGrG+N或GG+N。
29. 根据权利要求25所述的TSO,其中所述三个核苷酸残基是rGrG+G或GG+G。
30. 根据权利要求24-29中任一项所述的TSO在根据权利要求1-20中任一项所述的方法的双链cDNA的合成中的用途。

用于使用模板转换反应进行cDNA合成和单细胞转录组概况分析的方法和组合物

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2014年8月23日提交的美国临时专利申请序列号61/869,220的优先权,该申请的内容通过引用结合在此。

技术领域

[0003] 本发明涉及用于以改善的收率和平均长度合成双链cDNA的方法、以及合成的cDNA分子和由个体细胞产生的cDNA文库。

背景技术

[0004] 单细胞基因表达分析具有表征细胞异质性的前景,但是目前的方法牺牲了覆盖度、灵敏度或通量。存在若干用于由大量RNA构建全长cDNA的方法,包括帽富集过程(cap enrichment procedure)(丸山·K.(Maruyama,K.)和菅野·S.(Sugano,S.),基因(Gene)138,171-174(1994);卡宁奇·P.(Carninci,P.)和林崎·Y.(Hayashizaki,Y.),酶学方法(Meth.Enzymol.)303,19-44(1999);达什·M.(Das,M.)等人,生理基因组学(Physiol.Genomics)6,57-80(2001)),但是由单细胞量RNA获得全长覆盖度仍然是具有挑战性的。现有方法使用cDNA的3'端polyA加尾(例如,唐F.(Tang,F.)等人,自然方法(Nat.Methods)6,377-382(2009);笹川·Y.(Sasagawa,Y.)等人,基因组生物学(Genome Biol.)14,R31(2013))或模板转换(朱Y.Y.(Zhu,Y.Y.)等人,生物技术(BioTechniques)30,892-897(2001);拉姆斯科尔德·D.(Ramsköld D.)等人,自然生物技术(Nat.Biotechnol.)30,777-782(2012)),而其他方法由于早期多重化完全牺牲了全长覆盖度(伊斯兰·S.(Islam,S.)等人,基因组研究(Genome Res.)(2011)doi:10.1101/gr.110882.110;哈希姆绍尼T.(Hashimshony T.)等人,细胞报告(Cell Rep.)2,666-673(2012))。最近已经表明,与polyA加尾方法相比,依赖模板转换的Smart-Seq在整个转录物上具有更加均匀的读段覆盖度(拉姆斯科尔德·D.等人,自然生物技术30,777-782(2012)),与模板转换在设计来直接捕获RNA 5'端的应用中的常见使用一致,这些应用包括nanoCAGE(普莱西C.(Plessy,C.)等人,自然方法7,528-534(2010))和STRT(伊斯兰S.等人,基因组研究(2011)doi:10.1101/gr.110882.110)。利用模板转换的单细胞应用依赖于逆转录、模板转换反应以及统一聚合酶链式反应(PCR)预扩增的效率来获得足量的代表性cDNA以用于测序。尽管广泛使用这些反应,但是尚未报道由单细胞量改善cDNA文库收率和平均长度的系统性努力。

发明内容

[0005] 本发明提供用于合成cDNA的改进方法,具体而言,在逆转录中,利用模板转换反应进行单细胞应用的模板转换和预扩增,以增加由个体细胞产生的cDNA文库的收率和平均长度。结合这些差异的单细胞转录组分析具有改善的灵敏度和准确度,并且偏差较少且更易

进行成本有效的自动化。

[0006] 确切地讲,为了改善由单细胞进行的全长转录组概况分析,本申请披露了在cDNA文库收率和长度方面对逆转录、模板转换寡核苷酸(TSO)以及PCR预扩增的大量变型的评估、以及这些结果与商用Smart-Seq(以下称为SMARTer®)的比较。在此披露的改进出人意料且显著地增加了从少至1ng的启动总RNA获得的cDNA的收率和长度。

[0007] 在一个实施例中,本发明提供了一种用于制备与RNA分子互补的DNA的方法,该方法包括在包含锁核酸残基的模板转换寡核苷酸(TSO)的存在下进行逆转录反应。

[0008] 在另一个实施例中,本发明提供了一种增加cDNA收率的方法,包括在cDNA合成中使用诸如甲基基团供体的添加剂。在一个实施例中,该甲基基团供体是甜菜碱。

[0009] 在另一个实施例中,本发明提供了一种增加cDNA收率的方法,包括在cDNA的合成中使用增大浓度的金属盐,例如MgCl₂。

[0010] 在一个优选实施例中,该方法包括在cDNA合成中与增大浓度的MgCl₂结合使用甲基基团供体。在一个特别优选的实施例中,该方法包括与增大浓度的MgCl₂结合使用甲基基团供体甜菜碱,该方法已显示出对cDNA收率的显著的正面影响。

[0011] 在另一个实施例中,本发明提供了一种增加预扩增cDNA的平均长度的方法,包括在RNA变性之前而不是在逆转录酶(RT)主混合物中给予dNTP。

[0012] 在另一个实施例中,本发明提供了一种通过根据在此披露的实施例中任一个所述的方法产生的cDNA文库。

[0013] 在另一个实施例中,本发明提供了根据在此披露的实施例中任一个产生的cDNA文库用于单细胞转录组概况分析的用途。

[0014] 在另一个实施例中,本发明提供了一种用于分析多个单细胞中的基因表达的方法,包括根据在此披露的实施例中任一个所述的方法制备cDNA文库的步骤;并且对该cDNA文库进行测序。

[0015] 已根据本发明证实,在纯化的RNA上进行的这些方法可适用于包括例如哺乳动物细胞的个体后生动物细胞。

[0016] 在另一个实施例中,本发明提供了一种在其3'末端包含LNA的模板转换寡核苷酸(TSO)。

[0017] 在另一个实施例中,本发明提供了根据在此披露的实施例中任一个所述的TSO用于合成双链cDNA的用途。

[0018] 参考以下附图和详细描述将更好地理解本发明的这些和其他方面。

附图说明

[0019] 图1示出cDNA文库收率和长度的改善。(A)相对于使用rG3o1igo获得的那些,使用不同的模板转换寡核苷酸,由1ng总RNA获得的预扩增cDNA的中值收率。所有oligo序列见于表1中。(B)相对于使用类似SMARTer®的条件(甜菜碱和6mM Mg²⁺)获得的cDNA收率,在具有甜菜碱(黑色)或不具有甜菜碱(灰色)的反应液中由1ng总RNA获得且随着增大的Mg²⁺浓度变化的预扩增cDNA的中值收率。(C)在RNA变性之前(早期)或在RT主混合物(晚期)中采用dNTP的反应液中由1ng总小鼠脑RNA产生的预扩增cDNA的长度。(D)利用优化方案使用LNA-G和SMARTer® IIA模板转换寡核苷酸由HEK293T细胞获得的预扩增cDNA的中值收率。虚线指示

从商用SMARTer®反应液获得的中值收率。(E)在具有或不具有甜菜碱的反应液中由DG-75细胞获得的预扩增cDNA的中值收率。(F)在具有或不具有珠粒提取的情况下在反应液中由单一HEK293T细胞产生的cDNA文库的长度。注意,脑mRNA天然长于细胞系mRNA。(A-F)以柱状图表示重复测量结果,并且每种条件的重复数在括号中指出。使用学生t检验确定平均收率或长度的显著差异。

[0020] 图2示出单细胞中的灵敏的全长转录组概况分析。(A)根据表达水平分框的平行细胞中可重复检测的基因的百分比。在优化方案和SMARTer®的重复内进行所有成对比较并且报告为平均值和90%的置信区间。(B)根据表达水平分类的基因框中的重复之内的基因表达估测值的标准差。误差条, s.e.m. ($n \geq 4$)。(C)在不同的RPKM截止值下,使用SMARTer®和优化方案在HEK293T细胞中检测到的基因的平均数目。在所有RPKM阈值下均获得优化方案中基因检测的显著增加(全部在 $p < 0.5$ 下;学生t检验)。(D)在根据它们的GC含量分类的基因框中表达的(RPKM > 1)检测基因的平均分数。来自人组织的mRNA-Seq数据被包含作为未预扩增对照。误差条表示SEM ($n \geq 4$),并且下方的图示出每个框中的基因的GC范围。(E)对于使用不同方案产生的单细胞数据,比对到基因的3'最末端的20%、5'最末端的20%以及中间60%的读段的平均分数。(F)单细胞基因表达数据的主成分分析显示出两个最显著的成分。根据预扩增酶和方案变体对细胞进行着色。

[0021] 图3示出在模板转换寡核苷酸中使用LNA碱基的cDNA收率。

[0022] 图4示出单细胞RNA-Seq灵敏度和变异性。(A)平行细胞中可重复检测的基因的百分比。(B)基因表达估测值的标准差。

[0023] 图5示出使用另一个分析通道对单细胞RNA-Seq结果的验证。(A)平行细胞中可重复检测的基因的百分比。(B)基因表达估测值的标准差。(C)检测基因的平均数目。(D)所表达的检测基因的平均分数。(E)对于使用不同方案产生的单细胞数据,比对到基因的3'最末端的20%、5'最末端的20%以及中间60%的读段的平均分数。

[0024] 图6示出用Smart-Seq2、Quartz-Seq以及SMARTer产生的单细胞转录组学数据的比较。(A)平行细胞中可重复检测的基因的百分比。用Smart-Seq2和Quartz-seq进行所有成对比较,并且报告为平均数和90%的置信区间。(B)(A)中基因表达估测值的标准差。(C)平行细胞中可重复检测的基因的百分比。用Smart-Seq2和SMARTer®进行所有成对比较,并且报告为平均数和90%的置信区间。(D)(C)中基因表达估测值的标准差。(E)平行细胞中可重复检测的基因的百分比。用Quartz-seq进行所有成对比较,并且报告为平均数和90%的置信区间。(F)(E)中基因表达估测值的标准差。

[0025] 图7示出使用SMARTer、优化的Smart-Seq以及优化方案的变体产生的单细胞文库的映射统计。(A)对于每个单细胞RNA-Seq文库,具有1至9个错配的唯一比对读段(uniquely aligned reads)的分数。(B)唯一比对、比对到多个基因组坐标、或不比对到所有单细胞RNA-Seq文库的读段的百分比。(C)映射到外显子、内含子或基因间区域的唯一比对读段的分数。(D)每个细胞和文库制备方案的测序读段的数目。

[0026] 图8示出单细胞RNA-Seq方案中的基因表达和GC水平。

[0027] 图9示出单细胞RNA-Seq灵敏度和变异性。(A)平行细胞中可重复检测的基因的百分比。(B)基因表达估测值中的标准差。

[0028] 图10示出单细胞RNA-Seq数据中的在整个基因上的读段覆盖度。

[0029] 图11示出在整个转录物上的读段覆盖度。(A)所有基因的读段覆盖度的平均分数。(B)-(F)通过长度分组成5个相等大小的框的转录物。

[0030] 图12示出单细胞RNA-Seq数据中的读段峰。(A)每个单细胞RNA-Seq文库具有一个或多个高密度峰的基因的数目。(B)在最高数目的文库中具有峰的整个基因的读段密度的热图。

[0031] 图13示出使用Smart-Seq2的单细胞转录组学的技术和生物学变异性的评估。(A)在HEK细胞的稀释液中可重复检测的基因的百分比。(B)(A)中基因表达估测值的标准差。(C)在HEK总RNA的稀释液中可重复检测的基因的百分比。(D)(D)中基因表达估测值的标准差。(E)具有个体细胞的成对比较的(D)的基因表达估测值的标准差。

[0032] 图14示出用商用Tn5(Nextera公司(Nextera))产生的文库与用内部制备的Tn5产生的文库的比较。(A)使用内部条件可重复检测的基因的百分比。(B)(A)中基因表达估测值的标准差。(C)使用商用缓冲液和条件可重复检测的基因的百分比。(D)(D)中基因表达估测值的标准差。(E)在(A)中进行的反应的差异。

具体实施方式

[0033] 本申请披露了用于以改善的逆转录、模板转换以及预扩增进行cDNA合成以增加由个体细胞产生的cDNA文库的收率和平均长度的方法。

[0034] 在一个实施例中,本发明提供一种用于制备与RNA分子互补的DNA的方法,包括以下步骤:

[0035] 使cDNA合成引物退火于该RNA分子并且合成第一cDNA链以形成RNA-cDNA中间体;并且

[0036] 通过使该RNA-cDNA中间体与模板转换寡核苷酸(TSO)在适于与该RNA分子互补的该第一DNA链延伸的条件下接触进行逆转录酶反应,从而使该第一DNA链另外与该TSO互补,其中该TSO在其3'末端包含锁核酸(LNA)。

[0037] 在本发明的另一个实施例中,该逆转录反应在甲基基团供体和金属盐的存在下进行。

[0038] 在本发明的另一个实施例中,该甲基基团供体是甜菜碱。

[0039] 在本发明的另一个实施例中,该金属盐是镁盐。

[0040] 在本发明的另一个实施例中,该镁盐具有至少7mM、至少8mM或至少9mM的浓度。

[0041] 在本发明的另一个实施例中,该模板转换寡核苷酸任选地包含一个或两个核糖核苷酸残基。

[0042] 在本发明的另一个实施例中,该模板转换寡核苷酸包含至少一个或两个核糖核苷酸残基和一个LNA残基。

[0043] 在本发明的另一个实施例中,该至少一个或两个核糖核苷酸残基是核糖鸟嘌呤。

[0044] 在本发明的另一个实施例中,该锁核酸残基选自下组,该组由以下各项组成:锁鸟嘌呤、锁腺嘌呤、锁尿嘧啶、锁胸腺嘧啶、锁胞嘧啶以及锁5-甲基胞嘧啶。

[0045] 在本发明的另一个实施例中,该锁核酸残基是锁鸟嘌呤。

[0046] 在本发明的另一个实施例中,该锁核酸残基处于3'最末端位置。

[0047] 在本发明的另一个实施例中,该模板转换寡核苷酸在3'端包含两个核糖核苷酸残

基以及由式rGrG+N表征的一个锁核苷酸残基,其中+N表示一个锁核苷酸残基。

[0048] 在本发明的另一个实施例中,该模板转换寡核苷酸包含rCrG+G。

[0049] 在本发明的另一个实施例中,该甲基基团供体是甜菜碱,并且该金属盐是浓度为至少9mM的MgCl₂。

[0050] 在本发明的另一个实施例中,该方法进一步包括使用寡核苷酸引物扩增与RNA分子和模板转换寡核苷酸互补的DNA链。

[0051] 在本发明的另一个实施例中,该模板转换寡核苷酸选自表S2中的这些寡核苷酸。

[0052] 在本发明的另一个实施例中,该cDNA合成引物是一种oligo-dT引物。

[0053] 在本发明的另一个实施例中,该cDNA是在包括锚定的oligo-dT引物的珠粒上合成的。

[0054] 在本发明的另一个实施例中,该oligo-dT引物包含5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACT₃₀VN-3'的序列,其中“N”是任何核苷碱基,并且“V”选自下组,该组由以下各项组成:“A”、“C”以及“G”。

[0055] 在本发明的另一个实施例中,该方法进一步包括PCR预扩增、标签化、以及最终PCR扩增。

[0056] 在本发明的另一个实施例中,该PCR预扩增在未纯化从逆转录反应获得的cDNA的情况下进行。

[0057] 在本发明的另一个实施例中,该RNA是细胞中的总RNA。

[0058] 在另一个实施例中,本发明提供了一种通过根据在此披露的任一实施例所述的方法产生的cDNA文库。

[0059] 在另一个实施例中,本发明提供了通过根据在此披露的任一实施例所述的方法产生的cDNA文库用于单细胞转录组概况分析的用途。

[0060] 在另一个实施例中,本发明提供了一种用于分析多个单细胞中的基因表达的方法,该方法包括以下步骤:制备通过根据在此披露的任一实施例所述的方法产生的cDNA文库;并且对该cDNA文库进行测序。

[0061] 在另一个实施例中,本发明提供了一种在3'端包含锁核苷酸残基的模板转换寡核苷酸(TSO)。本发明的这些TSO可用于cDNA的合成以提高收率和长度。

[0062] 在另一个实施例中,该TSO在3'端包含三个核苷酸残基,其中所述三个核苷酸残基选自下组,该组由以下各项组成:+N+N+N、N+N+N、NN+N、rN+N+N、以及rNrN+N,其中N在每次出现时独立地为脱氧核糖核苷酸残基,rN在每次出现时独立地为核糖核苷酸残基,并且+N在每次出现时独立地为锁核苷酸残基。

[0063] 在一个实施例中,该TSO处于3'端的这三个核苷酸残基的5'侧的部分(在此也称为5'部分)包含由核糖核苷酸、脱氧核糖核苷酸、或其混合物构成的任意核苷酸序列。在一个优选实施例中,该TSO的5'部分包含所有核糖核苷酸。在另一个优选实施例中,该TSO的5'部分包含所有脱氧核糖核苷酸。

[0064] 在另一个实施例中,这些TSO中的锁核苷酸残基选自下组,该组由以下各项组成:锁鸟嘌呤、锁腺嘌呤、锁尿嘧啶、锁胸腺嘧啶、锁胞嘧啶、以及锁5-甲基胞嘧啶。

[0065] 在另一个实施例中,这些TSO的3'端的三个核苷酸残基是NN+G或rNrN+G,其中N在每次出现时独立地为脱氧核糖核苷酸残基,并且rN在每次出现时独立地为核糖核苷酸残

基。

[0066] 在另一个实施例中,这些TSO的3'端的三个核苷酸残基是rGrG+N,其中+N是锁核苷酸残基。

[0067] 在另一个实施例中,这些TSO的3'端的三个核苷酸残基是rGrG+G。

[0068] 这些TSO优选地具有从约10至约50个核苷酸、或从约15至约45个核苷酸、或从约20至约40个核苷酸、或从约24至约35个核苷酸、或约30个核苷酸的长度。

[0069] 在另一个实施例中,本发明提供了根据在此披露的实施例中任一个所述的TSO在cDNA合成中的用途。

[0070] 适用于本发明的金属阳离子的例子包括但不限于 Mg^{2+} 和 Mn^{2+} ,优选 Mg^{2+} ;并且它们的浓度可在0-30 μM 的范围内,优选范围是3-20 μM 、更优选的范围是9-12 μM 。

[0071] 除甲基供体甜菜碱之外,可在本发明的cDNA合成中添加的其他添加剂包括但不限于海藻糖、蔗糖、葡萄糖、麦芽糖、DMSO(二甲亚砜)、甲酰胺、非离子型洗涤剂、TMAC(氯化四甲基铵)、7-脱氮-2'-脱氧鸟苷(dC^7GTP)、牛血清白蛋白(BSA)、以及T4基因32蛋白。

[0072] 本发明适用于使用MMLV相关且具有模板转换活性的所有逆转录酶的反应。MMLV相关的逆转录酶包括野生型莫洛尼氏鼠白血病病毒及其变体,包括例如缺乏RNA酶H活性的衍生物,诸如SUPER-SCRIPT II(英杰(Invitrogen))、POWER SCRIPT(BD生物科学(BD Biosciences))以及SMART SCRIBE(Clontech公司(Clontech))。适用于本发明的TSO可包括条形码,包括但不限于分子条形码或样品条形码。

[0073] 根据本发明合成的cDNA可具有与根据任何文献方法合成的cDNA相同的应用,包括但不限于小量cDNA文库的构建、单细胞cDNA分析、单细胞基因表达分析、少数细胞cDNA分析、少数细胞基因表达分析、单细胞qPCR分析(使用该预扩增步骤)以及基于帽子捕获的扩增。

[0074] 以下非限制性实例说明本发明的某些方面。

[0075] 实例

[0076] 实例1

[0077] 方法

[0078] 使用总RNA的实验

[0079] 使用从小鼠脑中提取的、与用于Illumina测序的SMARTer[®] Ultra Low RNA试剂盒(Clontech公司)一起提供的对照总RNA进行RNA实验。在每个实验中使用一微升的1ng/ μl 溶液并且将其与1 μl 锚定的oligo-dT引物(10mM, 5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACT₃₀VN-3', 其中"N"是任何碱基并且"V"是"A"、"C"、或"G")和1 μl 的dNTP混合物(10mM, 富酶泰斯公司(Fermentas))混合,在72°C下变性3分钟并且之后立即放置在冰上。将7 μl 的第一链反应混合物添加至每个样品,该第一链反应混合物含有0.50 μl SuperScript II RT(200U ml⁻¹, 英杰)、0.25 μl RNA酶抑制剂(20U ml⁻¹, Clontech公司)、2 μl Superscript II第一链缓冲液(5x, 英杰)、0.25 μl DTT(100mM, 英杰)、2 μl 甜菜碱(5M, 西格玛(Sigma))、0.9 μl MgCl₂(100mM, 西格玛)、1 μl TSO(10 μM , oligo的完全列表可见于表S1中)以及0.1 μl 不含核酸酶的水(吉博公司(Gibco))。通过以下方式进行逆转录反应:在42°C下温育90分钟,接着进行10个循环(50°C下2分钟, 42°C下2分钟)。最后,通过在70°C下温育15分钟使RT失活。

[0080] PCR预扩增

[0081] 在原始的Smart-Seq方案中,在第一链cDNA合成之后进行使用Ampure XP珠粒进行纯化。然后在添加2 μ l Advantage 2聚合酶混合物(50X, Clontech公司)、5 μ l Advantage 2PCR缓冲液(10X, Clontech公司)、2 μ l dNTP混合物(10mM, Clontech公司)、2 μ l IS PCR引物(12 μ M, Clontech公司)以及39 μ l不含核酸酶的水至50 μ l的最终反应体积之后,在固定于珠粒上的cDNA上直接进行PCR。在本实例中,在RT之后不对cDNA进行纯化,而是仅添加相同的PCR主混合物,考虑到第一链cDNA合成之后的体积是10 μ l并且相应地调节水的量。将反应液在95℃下温育1分钟,然后在(95℃下15秒,65℃下30秒,68℃下6分钟)之间循环15次,在72℃下10分钟进行最终延伸。

[0082] 显著改善cDNA收率的第二改进是用KAPA HiFi HotStart ReadyMix(卡帕生物系统公司(KAPA Biosystems))替换Advantage 2聚合酶混合物。在这种情况下也省略第一链cDNA合成之后的纯化。PCR主混合物具有以下组成:25 μ l KAPA HiFi HotStart ReadyMix (2X, 卡帕生物系统公司)、1 μ l IS PCR引物(10mM, 5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3')以及14 μ l不含核酸酶的水(吉博公司)。所用程序如下:98℃3分钟,接着进行15个(98℃15秒,67℃20秒,72℃6分钟)循环,在72℃下5分钟进行最终延伸。

[0083] 不考虑所用的PCR方案,使用1:1比率的AMPure XP珠粒(贝克曼库尔特(Beckman Coulter))、在15 μ l的EB溶液(凯杰(Qiagen))中进行最终洗脱来纯化PCR。在1:5稀释之后,在高灵敏度DNA芯片(安捷伦生物分析仪(Agilent Bioanalyzer))上检查文库大小分布。预期的平均大小应在1.5-2.0kb左右并且应忽略低于300bp的片段的部分。为评估该方案中结合的不同改进的表现,对在安捷伦生物分析仪曲线图中包含在区间300-9000bp中的cDNA的量进行估测。

[0084] 标签化反应和最终PCR扩增

[0085] 然后将五纳克cDNA用于标签化反应,,添加25 μ l的2X Tagment DNA缓冲液和5 μ l的Tagment DNA酶,以50 μ l的最终体积使用Nextera®DNA样品制备试剂盒(Illumina公司)进行标签化反应。将标签化反应液在55℃下温育5分钟,接着用DNA Clean&Concentrator™-5试剂盒(Zymo研究公司(Zymo Research))进行纯化,在来自Nextera®试剂盒的20 μ l重悬缓冲液(RSB)中进行最终洗脱。然后使用全部体积,连同15 μ l的Nextera®PCR引物混合物(NPM)、5 μ l的Index 1引物(N7xx)、5 μ l的Index 2引物(N5xx)以及5 μ l的PCR引物混合液(PPC)进行有限循环富集PCR(limited-cycle enrichment PCR)。如下进行第二轮扩增:72℃3分钟,98℃30秒,接着进行5个(98℃10秒,63℃30秒,72℃3分钟)循环。用1:1比率的AMPure XP珠粒进行纯化并且将样品加样到高灵敏度DNA芯片上以检查文库的质量,同时使用Qubit高灵敏度DNA试剂盒(英杰)进行定量。将文库稀释至2nM的最终浓度,汇集并且在Illumina HiSeq 2000上测序。

[0086] 单细胞cDNA分离

[0087] 重悬于PBS中之后,在显微镜下手动挑取单个HEK293T(人)、DG-75(人)、C2C12(小鼠)以及MEF(小鼠)细胞。保持尽可能低的液体体积,通常低于0.5 μ l且优选低于0.3 μ l。然后将细胞转移至0.2ml薄壁PCR管,该薄壁PCR管含有2 μ l由0.2%Triton X-100(西格玛)和2U/ μ l的RNA酶抑制剂(Clontech公司)构成的温和的低渗裂解缓冲液。在整个过程中,将已经挑取的细胞保持在冰上,或在不立即使用时储存在-80℃下。所有下游步骤与使用总RNA时(参见上文)相同,唯一例外的是由于在单细胞中由RT获得的cDNA的量有限,所以使用高灵敏度

DNA芯片进行质量控制,其中用纯(未稀释)的样品加样。

[0088] 当使用总RNA工作时,观察到使用双倍TSO量或TSO和PCR酶的不同组合可增大cDNA收率(数据未示出)。为了验证这种发现,使用不同的TSO量(1或2 μ l的10 μ M溶液)、TSO类型(rGrGrG、rGrG+G或rGrG+N)或PCR酶(KAPA HiFi或Advantage 2)重复在HEK293T细胞上进行的一些实验。最显著的比较的测序结果报告于图S2-S7中。最终方案(即“最优化的”)是指在第一PCR(不进行AMPure XP珠粒纯化)中仅使用1 μ l的10 μ M rGrG+G TSO且KAPA HiFi HotStart ReadyMix作为酶的方案。

[0089] Smart-Seq实验

[0090] 为了评估和比较本发明的方法的表现,使用Smart-Seq方案按照制造商的说明书(参见Clontech手册)用相同的总RNA和单细胞产生cDNA文库。在PCR预扩增之后,将5ng的cDNA用于标签化反应并且以与如上所述完全相同的方式处理。

[0091] cDNA收率和长度的统计分析

[0092] 参照根据生物分析仪在3009,000bp范围内的cDNA收率和平均cDNA长度评估不同方案的表现。对于小鼠脑总RNA样品,选择一组实验以成对方式评估每个实验变量,其中所有其他变量是相同的。在该组实验之内,使用学生t检验和威尔科克森秩和检验评估两个变量之间收率或长度变化的显著性(表1,表单B)。

[0093] 在HEK293T细胞实验中,使用学生t检验和威尔科克森秩和检验将每个优化的实验设置彼此比较,并且与SMARTer[®]方案相比较(表3,表单B)。所有分析和图均在使用R的情况下产生。

[0094] 读段比对和基因表达评估

[0095] 使用Nextera双索引(i7+i5)在Illumina HiSeq 2000上对单细胞文库进行测序,在多路分用(demultiplexing)和去除细胞条形码之后,得到43bp插入读段。使用STAR 2.2.0版本(道斌(Dobin)等人,生物信息学(Bioinformatics)201329(1):15-21)利用默认设置将读段与人(hg19)或小鼠(mm10)基因组比对并且将这些读段过滤以获得唯一映射读段(uniquely mapping reads)。使用rpkmforgenes(拉姆斯科尔德(Ramskold)等人,PLoS计算生物学(PLoS Comp Biol),5,e1000598,2009),作为RPKM值计算Ensembl版本69和RefSeq(2013年2月)中的每个转录物的基因表达值。

[0096] 单细胞RNA-Seq灵敏度和变异性

[0097] 对来自每个实验设置的所有可能的技术重复对计算单一HEK293T细胞中的基因检测的分析(图2A、图5A以及7A)。通过两个样本中的表达水平将基因分框,并且如果两个样本中的RPKM均在0.1以上,那么视为已检测的。使用调整的沃尔德法(Wald method)将一个组之内所有可能的技术重复对的平均数与标准差一起使用。差异的分析(图2B和图5B以及7B)也在样本对上进行计算,通过对数表达的平均数将基因分框,排除任一样本中低于0.1RPKM的基因。由于所有单细胞的基因表达水平通常是对数正态分布的(本特松(Bengtsson)基因组研究(Genome Res)200515(10):1388-1392),所以通过将平均差乘以0.886来计算log10表达值的绝对差和标准差。

[0098] 读段覆盖度和GC公差的分析

[0099] 针对所有蛋白质编码基因的最长转录物,使用RSeQC-2.3.4软件包(王(Wang)、王(Wang)以及李(Li).生物信息学2012;28(16):2184-5)计算基因体覆盖度(图2E和图8)。对

于通过GC含量分框成10个相等大小的框的所有编码蛋白质的RefSeq基因,使用最长转录物计算在不同GC含量下的基因检测,并且计算没有检测或具有在不同RPKM截止值下的检测的基因的数目(图2D和图6)。

[0100] 读段峰分析

[0101] 一些基因表现出基因体之内的高密度读段无法解释的峰。为了鉴定这些区域,将每个基因的基因体分成101个相等大小的框,并且每个基因在该基因之内的平均读段分布上具有至少一个具有 >5 的标准差读段密度的框。在这些分析中,弃去具有低表达基因的基因(根据测序深度/细胞,所具有的读段少于大约2,000–10,000个读段的那些)。每个细胞中这类基因的数目在图9A中示出。并且在最高数目的HEK293T细胞中具有峰的基因表现为图9B中的热图,示出这些峰在所有实验中始终存在于相同位置。

[0102] 实例2

[0103] 为改善由单细胞获得的全长转录组概况分析,在cDNA文库收率和长度方面对逆转录、模板转换寡核苷酸(TSO)以及PCR预扩增的大量变型(总计457个实验)进行评估,并且将这些结果与商用Smart-Seq(以下称为SMARTer®)相比较(表1)。重要的是,改进被鉴定显著增大了由1ng启动总RNA获得的cDNA收率和长度(表1)。

[0104] 具体而言,相对于商用Smart-Seq所用的SMARTer® IIA oligo,仅将TSO 3'端(rGrG+G)的单个鸟苷酸换成锁核酸(LNA)鸟苷酸导致cDNA收率增加了2倍($p=0.003$,学生t检验;图1a、表2以及图3)。

[0105] 另外,发现甲基基团供体甜菜碱与较高的 $MgCl_2$ 浓度结合对收率具有显著的正面影响(增加2–4倍, $p=0.0012$,学生t检验,针对所有比较)(图1b)。商用Smart-Seq缓冲液具有6mM $MgCl_2$ 的最终浓度,但是在此发现当浓度增加至9mM或超出时获得较高的收率。最后,当在RNA变性之前而不是在RT主混合物中给予dNTP时,预扩增cDNA的平均长度增加370nt($p=7.8 \times 10^{-9}$,学生t检验;图1c)。

[0106] 进一步证实了用纯化RNA获得的这些改善扩展至在个体人和小鼠细胞的裂解物中直接进行的cDNA反应。为此,由跨越不同细胞大小和总RNA含量的总计262个个体人或小鼠细胞(159HEK293T、34DG-75、30C2C12以及39MEF细胞)产生单细胞cDNA文库(表3)。单细胞cDNA文库的分析表明在两种情况下获得较高的cDNA收率:使用含LNA的TSO(3倍增加, $p<0.001$,学生t检验;图1d)和甜菜碱连同高 Mg^{2+} 浓度一起存在(4倍增加, $p=3.7 \times 10^{-6}$,学生t检验;图1e)。

[0107] 单细胞方法的灵敏度和准确度受每个样本处理步骤效率的限制。在用Advantage2聚合酶(Adv2)预扩增之前,SMARTer®方案使用珠粒纯化从第一链cDNA反应液中去除了未掺入的衔接子。然而,在小体积中进行珠粒纯化对液体处理自动化提出重大的回收挑战。在此确定,KAPA HiFi Hot Start(KAPA)DNA聚合酶在逆转录之后立即有效地扩增第一链cDNA,而无需前面的珠粒纯化。不经珠粒纯化预扩增的文库的收率没有降低,但是平均cDNA长度增加了450nt($p=2.6 \times 10^{-12}$,学生t检验;图1f),表明KAPA预扩增改善了cDNA生成并且提供用于Smart-Seq自动化的可行方法。

[0108] 为了展示改善的cDNA生成对下游应用的重要性,估计了其对单细胞转录组概况分析的影响。为此,对根据商用SMARTer($n=4$)和使用本发明方案的变型产生的单一HEK293T细胞文库进行测序(Smart-Seq2, $n=35$)(表4)。

[0109] 由于可获得更多原始RNA分子用于测序,所以改善的RNA至cDNA转化率应改善基因表达概况分析。实际上,对于低丰度和中等丰度转录物观察到检测基因表达的能力的显著增加(图2a)和技术性偏差的降低(图2b和图4)。优化方案的改善的灵敏度导致在每个细胞中平均检测到2,372个以上的基因($p < 0.05$, 学生t检验;图2c)。使用替代性RNA-Seq比对和分析策略独立验证所有这些改善(图5)。此外,与Quartz-Seq获得的数据相比,在用Smart-Seq2产生的单细胞转录组数据中获得更好的灵敏度和更低的变异性(图6)。尽管测序的文库具有与SARTer文库相似的映射特征,但是注意到未映射的读段增加了7%(图7)。

[0110] 相比于与SMARTer[®]一起使用的Advantage 2(Adv2),若干预扩增酶具有更低的GC偏差,表明使用KAPA的cDNA预扩增也可改善单细胞概况分析。事实上,用KAPA预扩增的单细胞文库在更高GC水平下检测到更多的基因(图2d和图8)并且改善灵敏度和准确度(图9)。当与通过cDNA的3'端polyA加尾产生的单细胞数据中的5'区域的低覆盖度相比时,已用KAPA预扩增的单细胞RNA-Seq文库在整个转录物全长上具有显著更好的覆盖度($p < 10^{-5}$, 对于5'和3'端分别为 1.6×10^{-3} , 学生t检验),因为它们在5'和3'端达到预期的读段分数(图2e和图10-11)。重要的是,在第一主成分上分离的使用KAPA和Adv2预扩增的细胞的总体基因表达谱(图2f)表明预扩增偏差对绝对表达水平具有显著影响。对与必定会过滤的预扩增酶无关而在Smart-Seq中系统性地出现的具有所比对的人工大量读段的区域(即,峰)进行测序(图12)。总而言之,数据显示使用KAPA进行预扩增改善了GC公差和在整个转录物上的读段覆盖度。

[0111] 为确定使用Smart-Seq2的单细胞转录组概况分析中的技术变异性程度,由HEK293T细胞的稀释系列(100、50以及10个细胞)以及总RNA(1ng、100pg、10pg)产生测序文库。当分析10个或更多个细胞时,技术性损失和偏差是小的,但是在单细胞水平下存在相当大的变异性,如先前所观察到的。将相同或不同细胞类型来源的细胞中存在的技术变异性与生物学变异性相对比是有益的(图13A-D)。为此,对来自DG-75($n=7$)、C2C12($n=6$)以及MEF($n=7$)细胞的另外的单细胞转录组进行测序。分析细胞群之间和细胞群之内的生物学变异性揭示,与细胞类型特异性表达相关的生物学变异性超过技术变异性大约50RPKM,但是确切的阈值将取决于所研究的细胞类型中的RNA含量(图13E)。

[0112] 本发明提供一种改善灵敏度、准确度以及在整个转录物上的覆盖度且更易于自动化的新方案。此外,新方案每个反应的费用小于当前方案的12%并且当使用内部制备的Tn5时仅为3%(图14)。

[0113] 尽管在Smart-Seq单细胞基因表达分析的背景中实现了这些结果,但是这些改进也可适用于依赖于模板转换的其他单细胞方法,包括在微流控芯片(例如Fluidigm C1)上或在乳液滴内部进行的那些。

[0114] 上述实例和优选实施例的描述应视为说明而不是限制如权利要求所限定的本发明。应当容易认识到,在不脱离如权利要求所阐述的本发明的情况下,可利用以上所阐述的特征的大量变型和组合。这类变型不视为脱离本发明的精神和范围,并且所有这类变型旨在被包括在以下权利要求的范围内。

[0115] 在此所引用的所有参考文件通过引用以其全部内容结合在此。

[0117]

					剂盒，但是替 换FSB				er Oligo IIA	cribe		F 90 分钟	ge		MnCl 2
5	1	15	10	1	改进的 SMARTer试 剂盒	393	168	3	SMART er Oligo IIA	1	SSRTH	6	Advanta ge	50	-
6	1	15	10	1	改进的 SMARTer试 剂盒	121	178	0	rG5	1	SMARTs	6	Advanta ge	50	-
7	1	15	10	1	改进的 SMARTer试 剂盒	1038	134	6	rGrGrG	1	SMARTs	6	Advanta ge	50	-
8	1	15	10	1	改进的 SMARTer试 剂盒	90	165	2	rGrGrG p	1	SMARTs	6	Advanta ge	50	-
9	1	15	10	1	改进的 SMARTer试 剂盒	84	160	8	ISO	1	SMARTs	6	Advanta ge	50	-
10	1	15	10	1	SMARTer试 剂盒	3628	183	8	SMART er Oligo IIA	1	SMARTs	6	Advanta ge	50	-
11	1	15	10	1	改进的 SMARTer试 剂盒	650	210	8	rG5	1	SMARTs	6	Advanta ge	50	-
12	1	15	10	1	改进的 SMARTer试 剂盒	6423	185	2	rGrGrG	1	SMARTs	6	Advanta ge	50	-
13	1	15	10	1	改进的	666	218	7	rGrGrG p	1	SMARTs	6	Advanta ge	50	-

[0119]

23	1	15	不适用	适用	试剂盒，但是使用Superscript II FSB (3 mM MgCl ₂)	192	1609	SMARTer Oligo IIA	1	SMARTs crible	3	42°C F 90 分钟	-	是	Advanta ge	50	-	-
24					SMARTer试剂盒，但是使用Superscript II FSB (3 mM MgCl ₂)	失败		SMARTer Oligo IIA	1	SMARTs crible	-	42°C F 90 分钟	-	是	Advanta ge	50	6 mM MnCl ₂	-
25	1	15	不适用	适用	SMARTer试剂盒	1573	2378	SMARTer Oligo IIA	1	SMARTs crible	6	42°C F 90 分钟	-	是	Advanta ge	50	-	-
26	1	15	不适用	适用	改进的SMARTer试剂盒	246	2024	rG5	1	SMARTs crible	3	42°C F 90 分钟	-	是	Advanta ge	50	-	-
27	1	15	不适用	适用	改进的SMARTer试剂盒	1393	1945	rGrGrG	1	SMARTs crible	3	42°C F 90 分钟	-	是	Advanta ge	50	-	-
28	1	15	不适用	适用	改进的SMARTer试剂盒	259	2180	rGrGrG p	1	SMARTs crible	3	42°C F 90 分钟	-	是	Advanta ge	50	-	-
29	1	15	不适用	适用	改进的SMARTer试剂盒	776	1958	SMARTer Oligo IIA	1	SMARTs crible	6	42°C F 90 分钟	-	是	Advanta ge	50	-	-

[0120]

30	1	15	不适用	不适用	改进的 SMARTer试 剂盒	731	180 8	SMART er Oligo IIA	1	SMARTs cribe	6	42°C F90 分钟	2	是	Advanta ge	50	-	-
31	1	15	不适用	不适用	改进的 SMARTer试 剂盒	1936	196 5	SMART er Oligo IIA	1	SMARTs cribe	6	42°C F90 分钟	1	是	Advanta ge	50	-	-
32					改进的 SMARTer试 剂盒	失败		SMART er Oligo IIA	1	SMARTs cribe	6	42°C F90 分钟	1	是	Advanta ge	50	3 mM MnCl 2	-
33					改进的 SMARTer试 剂盒	失败		SMART er Oligo IIA	1	SMARTs cribe	6	42°C F90 分钟	-	是	Advanta ge	50	3 mM MnCl 2, 5% DMS O	-
34	1	15	不适用	不适用	SMARTer试 剂盒	580	263 4	SMART er Oligo IIA	1	SMARTs cribe	6	42°C F90 分钟	-	是	Advanta ge	50	-	-
35	1	15	不适用	不适用	改进的 SMARTer试 剂盒	166	220 8	SMART er Oligo IIA	1	SMARTs cribe	3	42°C F90 分钟	1	是	Advanta ge	50	-	-
36	1	15	不适用	不适用	改进的 SMARTer试 剂盒	204	201 6	SMART er Oligo IIA	1	SMARTs cribe	3	42°C F90 分钟	1	是	Advanta ge	50	-	-
37	1	15	不适用	不适用	改进的 SMARTer试 剂盒	547	217 1	SMART er Oligo IIA	1	SMARTs cribe	6	42°C F90 分钟	1	是	Advanta ge	50	-	-
38	1	15	不适用	不适用	改进的 SMARTer试 剂盒	640	202 8	SMART er Oligo IIA	1	SMARTs cribe	6	42°C F90 分钟	1	是	Advanta ge	50	-	-

[0121]

39	1	15	用 不 适 用	用 不 适 用	试剂盒 改进的 SMARTer试 剂盒	145	193 8	rGrGrG	1	SMARTs cribe	3	42°C F90 分钟	1	是	Advanta ge	50	-	-
40	1	15	用 不 适 用	用 不 适 用	试剂盒 改进的 SMARTer试 剂盒	224	184 1	rGrGrG	1	SMARTs cribe	3	42°C F90 分钟	1	是	Advanta ge	50	-	-
41	1	15	用 不 适 用	用 不 适 用	试剂盒 改进的 SMARTer试 剂盒	496	186 3	rGrGrG	1	SMARTs cribe	6	42°C F90 分钟	1	是	Advanta ge	50	-	-
42	1	15	用 不 适 用	用 不 适 用	试剂盒 改进的 SMARTer试 剂盒	493	191 1	rGrGrG	1	SMARTs cribe	6	42°C F90 分钟	1	是	Advanta ge	50	-	-
43	1	15	20	-	内部方案	8431	222 6	rGrGrG	1	SSRTH	6	42°C F90 分钟	1	是	Advanta ge	50	-	-
44	1	15	20	-	内部方案	8248	223 5	rGrGrG	1	SSRTH	6	42°C F90 分钟	1	是	Advanta ge	50	-	-
45	1	15	20	-	内部方案	7672	231 7	rGrGrG	1	SSRTH	6	42°C F90 分钟	1. 5	是	Advanta ge	50	-	-
46	1	15	20	-	内部方案	6562	224 8	rGrGrG	1	SSRTH	6	42°C F90 分钟	1. 5	是	Advanta ge	50	-	-
47	1	15	20	-	SMARTer试 剂盒	8156	229 8	SMART er Oligo IIA	1	SMARTs cribe	6	42°C F90 分钟	-	是	Advanta ge	50	-	-

[0122]

48	1	15	20	-	内部方案	1744	259 2	rGrGrG p	1	SSRTII	6	42°C 下90 分钟	1	是	Advanta ge	50	-	-
49	1	15	20	-	内部方案	1820	258 5	rGrGrG p	1	SSRTII	6	42°C 下90 分钟	1	是	Advanta ge	50	-	-
50	1	15	20	-	内部方案	1591	254 1	rGrGrG p	1	SSRTII	6	42°C 下90 分钟	1.5	是	Advanta ge	50	-	-
51	1	15	20	-	内部方案	1398	261 6	rGrGrG p	1	SSRTII	6	42°C 下90 分钟	1.5	是	Advanta ge	50	-	-
52	1	15	20	-	内部方案	2265	211 0	dGCGG G	1	SSRTII	6	42°C 下90 分钟	1	是	Advanta ge	50	-	-
53	1	15	20	-	内部方案	2568	212 5	dGCGG G	1	SSRTII	6	42°C 下90 分钟	1	是	Advanta ge	50	-	-
54	1	15	20	-	内部方案	2263	207 9	dGCGG G	1	SSRTII	6	42°C 下90 分钟	1	是	Advanta ge	50	-	-
55	1	15	20	-	内部方案	691	229 0	dGCGG Gp	1	SSRTII	6	42°C 下90 分钟	1	是	Advanta ge	50	-	-
56	1	15	20	-	内部方案	757	234 4	dGCGG Gp	1	SSRTII	6	42°C 下90 分钟	1	是	Advanta ge	50	-	-
57	1	15	20	-	内部方案	690	229 4	dGCGG Gp	1	SSRTII	6	42°C 下90 分钟	1	是	Advanta ge	50	-	-

[0123]

58	1	15	20	-	SMARTer 试剂盒	6525	2295	SMART er Oligo IIA	1	SMARTs criste	6	42°C 下90 分钟	-	是	Advanta ge	50	-	-
59	1	15	20	-	SMARTer 试剂盒	6806	2270	SMART er Oligo IIA	1	SMARTs criste	6	42°C 下90 分钟	-	是	Advanta ge	50	-	-
60	1	15	20	-	内部方案, 在 添加裂解缓 冲液 (LB) 之 后立即处理	5922	1861	rGrGrG	1	SSRTII	6	42°C 下90 分钟	1	是	Advanta ge	50	-	-
61	1	15	20	-	内部方案, 在 添加裂解缓 冲液 (LB) 之 后立即处理	5419	1892	rGrGrG	1	SSRTII	6	42°C 下90 分钟	1	是	Advanta ge	50	-	-
62	1	15	20	-	内部方案, 在 添加裂解缓 冲液 (LB) 之 后立即处理、 在添加裂解 缓冲液 (LB) 60分钟之后 处理, 在室温 下保存	5664	1806	rGrGrG	1	SSRTII	6	42°C 下90 分钟	1	是	Advanta ge	50	-	-
63	1	15	20	-	内部方案, 在 添加裂解缓 冲液 (LB) 之 后立即处理、	5554	1800	rGrGrG	1	SSRTII	6	42°C 下90 分钟	1	是	Advanta ge	50	-	-

[0124]

64	1	15	20	-	在添加裂解 缓冲液 (LB) 45分钟之后 处理, 在室温 下储存	5552	177	2	rGrGrG	1	SSRTH	6	42°C 下90 分钟	1	是	Advanta ge	50	-	-
65	1	15	20	-	内部方案, 在 添加裂解缓 冲液 (LB) 之 后, 立即处理, 在添加裂解 缓冲液 (LB) 30分钟之后 处理, 在室温 下储存	6335	182	4	rGrGrG	1	SSRTH	6	42°C 下90 分钟	1	是	Advanta ge	50	-	-
66	1	15	20	-	内部方案, 在 添加裂解缓 冲液 (LB) 之 后, 立即处理, 在添加裂解	4904	170	0	rGrGrG	1	SSRTH	6	42°C 下90 分钟	1	是	Advanta ge	50	-	-

[0125]

67	1	15	20	-	缓冲液 (LB) 60分钟之后 处理, 储存在 冰箱中	3938	154	4	rGrGrG	1	SSRTH	6	42°C 下90 分钟	1	是	Advanta ge	50	,	,
68	1	15	20	-	内部方案, 在 添加裂解缓 冲液 (LB) 之 后立即处理, 在添加裂解 缓冲液 (LB) 45分钟之后 处理, 储存在 冰箱中	3793	158	5	rGrGrG	1	SSRTH	6	42°C 下90 分钟	1	是	Advanta ge	50	,	,
69	1	15	20	-	内部方案, 在 添加裂解缓 冲液 (LB) 之 后立即处理, 在添加裂解 缓冲液 (LB)	5312	182	4	rGrGrG	1	SSRTH	6	42°C 下90 分钟	1	是	Advanta ge	50	,	,

[01 26]

70	1	15	30	-	1024	154	7	rGrGrG	1	SSRTH	6	42°C F90 分钟	1	是	Advanta ge	50	-	3 mM MnCl 2
10分钟之后 处理、储存在 冰箱中																		
内部方案, 在 42°C下逆转 录1 h, 接着添 加3 mM MnCl2并且温 育15分钟																		
71	1	15	30	-	849	141	2	rGrGrG	1	SSRTH	6	42°C F90 分钟	1	是	Advanta ge	50	-	3 mM MnCl 2
内部方案, 在 42°C下逆转 录1 h, 接着添 加3 mM MnCl2并且温 育15分钟																		
72	1	15	30	-	558	122	7	rGrGrG	1	SSRTH	6	42°C F90 分钟	1	是	Advanta ge	50	-	6 mM MnCl 2
内部方案, 在 42°C下逆转 录1 h, 接着添 加6 mM MnCl2并且温 育15分钟																		
73	1	15	30	-	572	119	9	rGrGrG	1	SSRTH	6	42°C F90 分钟	1	是	Advanta ge	50	-	6 mM MnCl 2
内部方案, 在 42°C下逆转 录1 h, 接着添 加6 mM MnCl2并且温 育15分钟																		
74	1	15	30	-	2105	205	1	rGrGrG	1	SSRTH	6	42°C F90 分钟	1	是	Advanta ge	50	-	-
内部方案																		

[0127]

75	1	15	30	-	内部方案	1664	180	9	rGrGrG	1	SSRTH	6	42°C F90 分钟	1	是	Advanta ge	50	-	-
76	10	0	10	15	1: 5	内部方案	3196	194	6	2OMe	1	SSRTH	6	42°C F90 分钟	1	是	Advanta ge	50	-
77	10	0	10	15	1: 5	内部方案	8894	176	7	rGrG+G	1	SSRTH	6	42°C F90 分钟	1	是	Advanta ge	50	-
78	10	0	10	15	1: 5	内部方案	1939	205	4	ddC	1	SSRTH	6	42°C F90 分钟	1	是	Advanta ge	50	-
79	10	0	10	15	1: 5	内部方案	1942	128	6	rGrGrG	1	SSRTH	6	42°C F90 分钟	1	是	Advanta ge	50	-
80	10	10	12	15	1: 5	内部方案	1635	189	1	2OMe	1	SSRTH	6	42°C F90 分钟	1	是	Advanta ge	50	-
81	10	10	12	15	1: 5	内部方案	1230	170	5	2OMe	1	SSRTH	6	42°C F90 分钟	1	是	Advanta ge	50	-
82	10	10	12	15	1: 5	内部方案	4700	160	2	rGrG+G	1	SSRTH	6	42°C F90 分钟	1	是	Advanta ge	50	-
83	10	10	12	15	1: 5	内部方案	4051	171	7	rGrG+G	1	SSRTH	6	42°C F90 分钟	1	是	Advanta ge	50	-

[0128]

84	10	12	15	5	1:	内部方案	733	190 4	ddC	1	SSRTH	6	分钟 42°C 下90	1	是	Advanta ge	50	-	-
85	10	12	15	5	1:	内部方案	637	189 7	ddC	1	SSRTH	6	分钟 42°C 下90	1	是	Advanta ge	50	-	-
86	10	12	15	5	1:	内部方案	1104	155 6	rGrG+G	1	SSRTH	6	分钟 42°C 下90	1	是	Advanta ge	50	-	-
87	1	15	15	5	1:	内部方案	923	173 4	2OMe	1	SSRTH	6	分钟 42°C 下90	1	是	Advanta ge	50	-	-
88	1	15	15	5	1:	内部方案	842	162 0	2OMe	1	SSRTH	6	分钟 42°C 下90	1	是	Advanta ge	50	-	-
89	1	15	15	5	1:	内部方案	3387	142 6	rGrG+G	1	SSRTH	6	分钟 42°C 下90	1	是	Advanta ge	50	-	-
90	1	15	15	5	1:	内部方案	3609	147 3	rGrG+G	1	SSRTH	6	分钟 42°C 下90	1	是	Advanta ge	50	-	-
91	1	15	15	5	1:	内部方案	401	146 3	ddC	1	SSRTH	6	分钟 42°C 下90	1	是	Advanta ge	50	-	-
92	1	15	15	5	1:	内部方案	470	166 1	ddC	1	SSRTH	6	分钟 42°C 下90	1	是	Advanta ge	50	-	-

[0129]

93	1	15	15	1:5	内部方案	1550	134	1	rGrGrG	1	SSRTH	6	42°C F90 分钟	1	是	Advanta ge	50	-	-
94	1	15	15	1:5	内部方案	1267	148	3	rGrGrG	1	SSRTH	6	42°C F90 分钟	1	是	Advanta ge	50	-	-
95	1	15	15	1:5	内部方案	2176	143	8	rGrG+G	1	SSRTH	6	42°C F90 分钟	1	是	Advanta ge	50	-	-
96	1	15	15	1:5	内部方案	1469	170	5	rGrGrG	1	SSRTH	9	42°C F90 分钟	1	是	Advanta ge	50	-	-
97	1	15	15	1:5	内部方案	2383	159	6	rGrG+G	1	SSRTH	9	42°C F90 分钟	1	是	Advanta ge	50	-	-
98	1	15	15	1:5	内部方案	1431	180	7	rGrGrG	1	SSRTH	12	42°C F90 分钟	1	是	Advanta ge	50	-	-
99	1	15	15	1:5	内部方案	3630	162	3	rGrG+G	1	SSRTH	12	42°C F90 分钟	1	是	Advanta ge	50	-	-
100	1	15	15	1:5	内部方案	1277	161	0	rGrGrG	1	SSRTH	15	42°C F90 分钟	1	是	Advanta ge	50	-	-
101	1	15	15	1:5	内部方案	1884	146	2	rGrG+G	1	SSRTH	15	42°C F90 分钟	1	是	Advanta ge	50	-	-
102	1	15	15	1:5	内部方案	1123	165	2	SMART er Oligo	1	SSRTH	6	42°C F90 分钟	1	是	Advanta ge	50	-	-

[0130]

103	1	15	15	1:	内部方案， KAPA HiFi在 洗涤珠粒1之 后	935	159 3	SMART er Oligo IIA	1	SSRTH	15	42°C 下90 分钟	1	是	Advanta ge	50	-	-
104	1	15	15	1:	内部方案， KAPA HiFi在 洗涤珠粒1之 后	2156	176 7	rGrG+G	1	SSRTH	12	42°C 下90 分钟	1	是	KAPA HiFi HS	50	-	-
105	1	15	15	1:	内部方案， KAPA HiFi在 洗涤珠粒1之 后	352	215 1	rGrG+G	1	SSRTH	12	42°C 下90 分钟	1	是	KAPA HiFi HS	50	-	-
106	1	15	15	1:	内部方案， KAPA HiFi在 洗涤珠粒2之 后	1729	161 1	rGrG+G	1	SSRTH	12	42°C 下90 分钟	1	是	KAPA HiFi HS	50	-	-
107	1	15	15	1:	内部方案， KAPA HiFi在 洗涤珠粒2之 后	203	207 3	rGrG+G	1	SSRTH	12	42°C 下90 分钟	1	是	KAPA HiFi HS	50	-	-
108	1	15	15	1:	内部方案， KAPA HiFi在 洗涤珠粒1+ 洗脱之后	1108	148 0	rGrG+G	1	SSRTH	12	42°C 下90 分钟	1	是	KAPA HiFi HS	50	-	-
109	1	15	15	1:	内部方案， KAPA HiFi在 洗涤珠粒1+ 洗脱之后	301	190 3	rGrG+G	1	SSRTH	12	42°C 下90 分钟	1	是	KAPA HiFi HS	50	-	-

[0131]

110	1	15	15	1:	5	内部方案， KAPA HiFi 在 洗漆珠粒 2+ 洗脱之后	1337	2	152	rGrG+G	1	SSRTH	12	42°C F90 分钟	1	是	KAPA HiFi HS	50	-	-	-
112	1	15	15	1:	5	内部方案， KAPA HiFi 在 洗漆珠粒 2+ 洗脱之后	383	5	193	rGrG+G	1	SSRTH	12	42°C F90 分钟	1	是	KAPA HiFi HS	50	-	-	-
113	1	15	15	1:	5	内部方案	2897	7	173	rGrG+G	1	SSRTH	12	42°C F90 分钟	1	是	Advanta ge	50	-	-	-
114	1	15	15	1:	5	内部方案	1853	6	170	rGrG+G	1	SSRTH	12	42°C F90 分钟	1	是	Advanta ge	50	-	-	-
115	1	15	15	1:	5	内部方案	1492	3	156	rGrG+G	1	Revertaid H-	4	42°C F90 分钟	1	是	Advanta ge	50	-	-	-
116	1	15	15	1:	5	内部方案	1236	2	147	rGrG+G	1	Revertaid H-	4	42°C F90 分钟	1	是	Advanta ge	50	-	-	-
117	1	15	15	1:	5	内部方案	1843	0	145	rGrG+G	1	Revertaid H-	6	42°C F90 分钟	1	是	Advanta ge	50	-	-	-
118	1	15	15	1:	5	内部方案	1465	6	134	rGrG+G	1	Revertaid H-	6	42°C F90 分钟	1	是	Advanta ge	50	-	-	-
119	1	15	15	1:	5	内部方案	2996	7	159	rGrG+G	1	Revertaid H-	9	42°C F90 分钟	1	是	Advanta ge	50	-	-	-

[0132]

120	1	15	15	1:	5	内部方案	2654	1530	1	rGrG+G	1	Revertaid H-	9	分钟 42°C 下90 分钟	1	是	Advanta ge	50	-	-
121	1	15	15	1:	5	内部方案	2159	1487	1	rGrG+G	1	Revertaid H-	12	分钟 42°C 下90 分钟	1	是	Advanta ge	50	-	-
122	1	15	15	1:	5	内部方案	1890	1412	1	rGrG+G	1	Revertaid H-	12	分钟 42°C 下90 分钟	1	是	Advanta ge	50	-	-
123	1	15	15	1:	5	内部方案	1504	1246	1	rGrG+G	1	Revertaid H-	15	分钟 42°C 下90 分钟	1	是	Advanta ge	50	-	-
124	1	15	15	1:	5	内部方案	1986	1474	1	rGrG+G	1	Revertaid H-	15	分钟 42°C 下90 分钟	1	是	Advanta ge	50	-	-
125	1	15	15	1:	5	内部方案	1109	1691	1	rGrG+G	1	SSRTH	-	分钟 42°C 下60 分钟, 接着 60°C 下90 分钟	-	是	Advanta ge	50	-	0.3 M 海藻 糖
126	1	15	15	1:	5	内部方案	1090	1752	1	rGrG+G	1	SSRTH	-	分钟 42°C 下60 分钟, 接着 60°C	-	是	Advanta ge	50	-	0.3 M 海藻 糖

[0133]

127	1	15	15	15	1:	内部方案	863	156	5	rGrG+G	1	SSRTH	-	下90分钟, 42°C 下60分钟, 接着60°C 下90分钟	-	是	Advanta ge	50	-	0.6 M 海藻糖
128	1	15	15	15	1:	内部方案	896	165	2	rGrG+G	1	SSRTH	-	下90分钟, 42°C 下60分钟, 接着60°C 下90分钟	-	是	Advanta ge	50	-	0.6 M 海藻糖
129	1	15	15	15	1:	内部方案	1078	165	5	rGrG+G	1	SSRTH	-	下90分钟, 42°C 下60分钟, 接着60°C 下90分钟	1	是	Advanta ge	50	-	0.3 M 海藻糖
130	1	15	15	15	1:	内部方案	562	151	7	rGrG+G	1	SSRTH	-	下90分钟, 42°C 下60分钟, 接着60°C 下90分钟	1	是	Advanta ge	50	-	0.3 M 海藻糖

[0134]

131	1	15	15	15	1:	5	内部方案	998	159	4	rGrG+G	1	SSRTH	-	下90 分钟 42°C 下60 分钟, 接着 60°C 下90 分钟	0.6	是	Advanta ge	50	-	0.3 M 海藻 糖
132	1	15	15	15	1:	5	内部方案	925	154	5	rGrG+G	1	SSRTH	-	下90 分钟 42°C 下60 分钟, 接着 60°C 下90 分钟	0.6	是	Advanta ge	50	-	0.3 M 海藻 糖
133	1	15	15	15	1:	5	内部方案	1155	161	8	rGrG+G	1	SSRTH	3	下90 分钟 42°C 下60 分钟, 接着 60°C 下90 分钟	1	是	Advanta ge	50	-	0.3 M 海藻 糖
134	1	15	15	15	1:	5	内部方案	603	143	3	rGrG+G	1	SSRTH	3	下90 分钟 42°C 下60 分钟, 接着 60°C 下90 分钟	1	是	Advanta ge	50	-	0.3 M 海藻 糖

[0136]

139	1	15	15	1	1: 5	内部方案	1397	1740	rGrG+G	I	SSRTII	-	分钟, 接着 42°C F90 分钟	-	是	Advantag	50	-	0.6 M 海藻糖
140	1	15	15	1	1: 5	内部方案	355	1425	rGrG+G	I	SSRTII	-	分钟, 接着 42°C F90 分钟	0.6	是	Advantag	50	-	0.6 M 海藻糖
141	1	15	15	1	1: 5	内部方案	1654	1598	rGrG+G	I	SSRTII	-	分钟, 接着 42°C F90 分钟	0.6	是	Advantag	50	-	0.6 M 海藻糖

[0137]

142	1	15	15	1:	内部方案	1470	148	0	rGrG+G	1	SSRTH	12	42°C 下30 分钟	0.6	是	Advanta ge	50	-	0.6 M 海藻 糖
143	1	15	15	1:	内部方案	1389	148	0	rGrG+G	1	SSRTH	12	42°C 下30 分钟, 接着 42°C 下30 分钟	0.6	是	Advanta ge	50	-	0.6 M 海藻 糖
144	1	15	15	1:	内部方案	3959	164	1	rGrG+G	1	SSRTH	12	42°C 下90 分钟, 接着 10× (50° C)下2 分钟	1	是	Advanta ge	50	-	-

[0138]

145	1	15	15	15	1:5	内部方案	3816	173	2	rGrG+G	1	SSRTH	12	42°C 下90 分钟, 接着 10× (60° C)F2 分钟 42°C 下2分 钟)	1	是	Advanta ge	50	-	-
146	1	15	15	15	1:5	内部方案	3179	176	9	rGrG+G	1	SSRTH	12	42°C 下90 分钟, 接着 10× (50° C)F2 分钟 42°C 下2分 钟)	0.5	是	Advanta ge	50	-	0.3 M 海藻 糖
147	1	15	15	15	1:5	内部方案	3271	182	8	rGrG+G	1	SSRTH	12	42°C 下90 分钟, 接着 10×	0.5	是	Advanta ge	50	-	0.3 M 海藻 糖

[0140]

150	1	15	15	1:	5	内部方案	3711	178	1	rGrG+G	1	SSRTH	12	42°C 下90 分钟, 接着 5× (50° CF2 分钟 -42°C 下2分 钟)	1	是	Advanta ge	50	-	-	-
151	1	15	15	1:	5	内部方案	4015	177	3	rGrG+G	1	SSRTH	12	42°C 下90 分钟, 接着 10× (50° CF2 分钟 -42°C 下2分 钟)	1	是	Advanta ge	50	-	-	-
152	1	15	15	1:	5	内部方案	3671	175	3	rGrG+G	1	SSRTH	12	42°C 下90 分钟, 接着 10× (50° CF2	1	是	Advanta ge	50	-	-	-

[0141]

153	1	15	15	15	1:5	内部方案	3498	1708	rGrG+G	1	SSRTH	12	42°C 下2分钟, 接着10× (50°C CF2 分钟 42°C 下2分钟)	1	是	Advanta ge	50	,	,
154	1	15	15	15	1:5	内部方案	3804	1610	rGrG+G	1	SSRTH	12	42°C 下2分钟, 接着15× (50°C CF2 分钟 42°C 下2分钟)	1	是	Advanta ge	50	,	,
155	1	15	15	15	1:5	内部方案	3613	1679	rGrG+G	1	SSRTH	12	42°C 下90分钟,	1	是	Advanta ge	50	,	,

[0142]

156	1	15	15	15	1:	5	内部方案	4595	163	0	rGtG+G	1	SSRTH	12	接着 15× (50° CF2 分钟 -42°C 下2分 钟)	1	是	Advanta ge	50	,
157	1	15	15	15	1:	5	内部方案	3457	152	5	rGtG+G	1	SSRTH	12	接着 20× (50° CF2 分钟 -42°C 下2分 钟)	1	是	Advanta ge	50	,

[0144]

161	1	15	15	5	1:	内部方案	1785	171	3rGrG+	1	SSRTH	12	CF2 分钟 -42°C 下2分 钟)	1	是	Advanta ge	50	-	-
								7	G				42°C 下90 分钟, 接着 10× (50° CF2 分钟 -42°C 下2分 钟)						
162	1	15	15	5	1:	内部方案	1086	192	2rGrG+	1	SSRTH	12	CF2 分钟 -42°C 下2分 钟)	1	是	Advanta ge	50	-	-
								8	G				42°C 下90 分钟, 接着 10× (50° CF2 分钟 -42°C 下2分 钟)						
163	1	15	15	5	1:	内部方案	1128	184	2rGrG+	1	SSRTH	12	42°C 下90	1	是	Advanta ge	50	-	-
								6	G										

[0145]

分钟，接着10×（50℃CF2分钟-42℃下2分钟）	42℃下90分钟，接着10×（50℃CF2分钟-42℃下2分钟）	164	1	15	15	15	1:5	内部方案	596	1892	磷酸盐	1	SSRTH	12	分钟，接着10×（50℃CF2分钟-42℃下2分钟）	1	是	Advantage	50	-	-
分钟，接着10×（50℃CF2分钟-42℃下2分钟）	42℃下90分钟，接着10×（50℃CF2分钟-42℃下2分钟）	165	1	15	15	15	1:5	内部方案	579	1922	磷酸盐	1	SSRTH	12	分钟，接着10×（50℃CF2分钟-42℃下2分钟）	1	是	Advantage	50	-	-

[0146]

166	1	15	15	1:5	内部方案	546	1830	C6氨基	1	SSRTH	12	下2分钟) 42°C 下90分钟,接着 10× (50° CF2 分钟 42°C 下2分钟)	1	是	Advanta ge	50	-	-
167	1	15	15	1:5	内部方案	419	1664	C6氨基	1	SSRTH	12	下2分钟) 42°C 下90分钟,接着 10× (50° CF2 分钟 42°C 下2分钟)	1	是	Advanta ge	50	-	-
168	1	15	15	1:5	内部方案	3076	1567	rGrG+G	1	SSRTH	12	下2分钟) 42°C 下90分钟,接着 10×	1	是	Advanta ge	50	-	-

[0148]

171	1	15	15	1:	5	内部方案	2152	145	5	rGrG+G	1	SSRTH	12	42°C 下90 分钟， 接着 10× (50° C)F2 分钟 -42°C 下2分 钟)	1	是	Advanta ge	50	-	-
172	1	15	15	1:	5	内部方案	1454	108	4	rGrG+G	1	SSRTH	12	42°C 下90 分钟， 接着 10× (50° C)F2 分钟 -42°C 下2分 钟)	1	是	Advanta ge	50	-	0.816 M1,2 丙二 醇
173	1	15	15	1:	5	内部方案	1331	110	6	rGrG+G	1	SSRTH	12	42°C 下90 分钟， 接着 10× (50° C)F2	1	是	Advanta ge	50	-	0.816 M1,2 丙二 醇

[0149]

174	1	15	15	5	1:	内部方案	1373	108	9	rGrG+G	1	SSRTH	12	分钟 -42℃ 下2分 钟)	1	是	Advanta ge	50	-	0.816 M 1,2 丙二 醇
175	1	15	15	5	1:	内部方案	1904	145	3	rGrG+G	1	SSRTH	12	分钟 -42℃ 下2分 钟)	1	是	Advanta ge	50	-	1.075 M乙 二醇
176	1	15	15	5	1:	内部方案	2855	139	0	rGrG+G	1	SSRTH	12	分钟, -42℃ 下90 分钟,	1	是	Advanta ge	50	-	1.075 M乙 二醇

[0151]

184	1	15	15	1:5	内部方案	2662	132	5	rGrG+G	1	Revertaid Premium	12	分钟 50°C 下90 分钟	1	是	Advan- ta ge	50	,	,
185	1	15	15	1:5	内部方案	2814	167	4	rGrG+G	1	SSRTH	12	分钟, 接着 10× (50° C下2 分钟 -42°C 下2分 钟)	1	是	Advan- ta ge	50	,	,
186					内部方案	失败			rGrG+G	1	SSRTH	12	分钟, 接着 10× (50° C下2 分钟 -42°C 下2分 钟)	1	是	长PCR 酶混合 物	50	,	,
187	1	15	15	1:5	内部方案, 以 100 ul不经纯	3155	176	4	rGrG+G	1	SSRTH	12	42°C 下90	1	,	Phusion HS	10 0	,	,

[0153]

190	1	15	15	1:5	内部方案, 以 100 ul不经纯化进行PCR	1697	169	7	rGtG+G	1	SSRTH	12	F2分 钟) 42°C 下90 分钟, 接着 10× (50° C)下2 分钟 42°C 下2分 钟)	1	-	Q5 NEB	10	0	-	-
191	1	15	15	1:5	内部方案, 以 100 ul不经纯化进行PCR	3278	163	9	rGtG+G	1	SSRTH	12	F2分 钟) 42°C 下90 分钟, 接着 10× (50° C)下2 分钟 42°C 下2分 钟)	1	-	KAPA HIFI HS	10	0	-	-
192	1	15	15	1:5	内部方案, 以 100 ul不经纯化进行PCR	3719	159	0	rGtG+G	1	SSRTH	12	F2分 钟) 42°C 下90 分钟, 接着 10×	1	-	KAPA HIFI HS	10	0	-	-

[0154]

193	1	15	15	15	1:5	内部方案, 以 50 ul不经纯 化进行PCR	3816	1630	rGrG+G	1	SSRTH	12	(50°C CF2 分钟 42°C 下2分 钟)	1	Advanta ge	50		
194	1	15	15	15	1:5	内部方案, 以 50 ul不经纯 化进行PCR	2462	1653	rGrG+G	1	SSRTH	12	(50°C CF2 分钟 42°C 下2分 钟)	1	Advanta ge	50		

[0155]

195	1	15	15	1	5	内部方案, 以 50 ul 不经纯 化进行PCR	2848	158	8	rG+G+G	1	SSRTH	12	42°C F90 分钟, 接着 10× (50° CTF2 分钟 -42°C F2分 钟)	1	-	Advanta ge	50	-	-	-
196	1	15	15	1	5	内部方案, 以 50 ul 不经纯 化进行PCR	2012	166	9	rG+G+G	1	SSRTH	12	42°C F90 分钟, 接着 10× (50° CTF2 分钟 -42°C F2分 钟)	1	-	Phusion HS	50	-	-	-
197	1	15	15	1	5	内部方案, 以 50 ul 不经纯 化进行PCR	1836	166	5	rG+G+G	1	SSRTH	12	42°C F90 分钟, 接着 10× (50° CTF2	1	-	Phusion HS	50	-	-	-

[0156]

198	1	15	15	5	1:	内部方案, 以 50 ul不经纯 化进行PCR	2542	177	1	rG+G+G	1	SSRTH	12	42°C F90 分钟, 接着 10× (50° C)F2 分钟 -42°C F2分 钟)	1	-	KAPA HiFi HS	50	-	-	-	-	-
199	1	15	15	5	1:	内部方案, 以 50 ul不经纯 化进行PCR	2393	180	8	rG+G+G	1	SSRTH	12	42°C F90 分钟, 接着 10× (50° C)F2 分钟 -42°C F2分 钟)	1	-	KAPA HiFi HS	50	-	-	-	-	-
200	1	15	15	5	1:	内部方案, 以 50 ul不经纯 化进行PCR	2200	193	3	rG+G+G	1	SSRTH	12	42°C F90 分钟,	1	-	Advan- ta ge	50	-	-	-	-	-

[0157]

201	1	15	15	15	1:5	内部方案, 以 50 ul 不经纯化进行PCR	2371	1920	rGrG+G	1	SSRTH	12	接着 10× (50° C)F2 分钟 -42° C 下2分钟)	1	-	Advanta ge	50	-	-
202	1	15	15	15	1:5	内部方案, 以 50 ul 不经纯化进行PCR	1717	1780	rGrG+G	1	SSRTH	12	接着 10× (50° C)F2 分钟 -42° C 下2分钟)	1	-	Q5 NEB	50	-	-

[0158]

203	1	15	15	15	1	5	内部方案，以 50 ul不经纯 化进行PCR	1868	175	9	rGrG+G	1	SSRTHI	12	42°C 下90 分钟， 接着 10× (50° CF2 分钟 42°C 下2分 钟)	1	Q5 NEB	50	,	,	,
204	1	15	15	15	1	5	内部方案	40	177	2	rGrG+G	1	SSRTHI	12	42°C 下90 分钟， 接着 10× (50° CF2 分钟 42°C 下2分 钟)	1	Advanta ge	50	,	,	,
205	1	15	15	15	1	5	内部方案	16	101	7	rGrG+G	1	SSRTHI	12	42°C 下90 分钟， 接着 10× (50° CF2 分钟 42°C 下2分 钟)	1	Advanta ge	50	,	,	,

[0159]

206	1	15	15	5	1:	内部方案	88	175	3	rGrG+G	1	SSRTHH	12	CF2 分钟 -42°C 下2分 钟)	42°C 下90 分钟、 接着 10× (50° CF2 分钟 -42°C 下2分 钟)	1	是	Advanta ge	50	,	,	,
207	1	15	15	5	1:	内部方案	61	155	7	rGrG+G	1	SSRTHH	12	CF2 分钟 -42°C 下2分 钟)	42°C 下90 分钟、 接着 10× (50° CF2 分钟 -42°C 下2分 钟)	1	是	Advanta ge	50	,	,	,
208	1	15	15	5	1:	内部方案	182	176	6	rGrG+G	1	SSRTHH	12	42°C 下90	42°C 下90	1	是	Advanta ge	50	,	,	,

[0161]

211	1	15	15	5	1:	内部方案	233	164 3	rGrG+G	1	SSRTH	12	下2分 钟) 42°C 下90 分钟, 接着 10× (50° C下2 分钟 42°C 下2分 钟)	1	是	Advanta ge	50	,	
212	1	15	15	5	1:	内部方案	447	160 2	rGrG+G	1	SSRTH	12	下2分 钟) 42°C 下90 分钟, 接着 10× (50° C下2 分钟 42°C 下2分 钟)	1	是	Advanta ge	50	,	
213	1	15	15	5	1:	内部方案	363	154 1	rGrG+G	1	SSRTH	12	下2分 钟) 42°C 下90 分钟, 接着 10×	1	是	Advanta ge	50	,	

[0162]

214	1	15	15	15	1:5	内部方案	1279	191	9	rGrG+G	1	SSRTH	12	(50°C F2 分钟 -42°C F2 分钟) 42°C F90 分钟、接着 10× (50°C F2 分钟 -42°C F2 分钟)	1	是	Advantage	50	,
215	1	15	15	15	1:5	内部方案	1739	195	9	rGrG+G	1	SSRTH	12	(50°C F2 分钟 -42°C F2 分钟) 42°C F90 分钟、接着 10× (50°C F2 分钟 -42°C F2 分钟)	1	是	Advantage	50	,

[0163]

216	1	15	15	1:	5	内部方案	1861	206	3	rGrG+G	1	SSRTH	12	42°C 下90 分钟, 接着 10× (50° CF2 分钟 42°C 下2分 钟)	1	是	Advanta ge	50	-	-
217	1	15	15	1:	5	内部方案 (40u SSRTH)	2329	226	0	rGrG+G	1	SSRTH	12	42°C 下90 分钟, 接着 10× (50° CF2 分钟 42°C 下2分 钟)	1	是	Advanta ge	50	是	-
218	1	15	15	1:	5	内部方案 (40u SSRTH)	2273	221	8	rGrG+G	1	SSRTH	12	42°C 下90 分钟, 接着 10× (50° CF2	1	是	Advanta ge	50	是	-

[0164]

219	1	15	15	5	1:	内部方案 (40u SSRTH, 在开 始时添加 dNTP+甜菜 碱)	2013	8	226	rG+G	1	SSRTH	12	分钟 -42°C 下2分 钟)	1	是	Advanta ge	50	是	.
220	1	15	15	5	1:	内部方案 (40u SSRTH, 在开 始时添加 dNTP+甜菜 碱)	1932	2	212	rG+G	1	SSRTH	12	分钟 -42°C 下2分 钟)	1	是	Advanta ge	50	是	.
221	1	15	15	5	1:	内部方案 (40u)	1877	9	200	rG+G	1	SSRTH	12	分钟 -42°C 下90 分钟, 接着 10× (50° C下2 分钟 -42°C 下2分 钟)	1	是	Advanta ge	50	是	.

[0165]

222	1	15	15	15	1	5	196	3	989	196	3	rGrG+G	1	SSRTH	12	接着 10× (50° CT2 分钟 42°C 下2分 钟)	1	是	Advanta ge	50	是	.
223	1	15	15	15	1	5	131	6	2269	131	6	rGrG+G	1	SSRTH	12	接着 10× (50° CT2 分钟 42°C 下2分 钟)	1	是	Advanta ge	50	是	.

[0166]

224	1	15	15	5	1:	内部方案 (40u SSRTH, 在开 始时添加除 所添加的 SSRTH之外 的所有试剂)	1926	2	129	rGrG+G	1	SSRTH	12	42°C 下90 分钟, 接着 10× (50° CF2 分钟 -42°C 下2分 钟)	1	是	Advanta ge	50	是	-
225	1	15	15	5	1:	内部方案 (40u SSRTH, 在开 始时添加除 所添加的 SSRTH之外 的所有试剂)	1536	7	129	rGrG+G	1	SSRTH	12	42°C 下90 分钟, 接着 10× (50° CF2 分钟 -42°C 下2分 钟)	1	是	Advanta ge	50	是	-
226	1	15	15	5	1:	内部方案	1604	5	192	rGrG+G	1	SSRTH	12	42°C 下90 分钟, 接着 10× (50°	1	是	Advanta ge	50	是	-

[0167]

227	1	15	15	5	1:	内部方案	1493	0	191	rGrG+G	1	SSRTH	12	CF2 分钟 -42°C 下2分 钟)	1	是	Advanta ge	50	是	-
														42°C 下90 分钟、 接着 10s (50° CF2 分钟 -42°C 下2分 钟)						
228	1	15	15	5	1:	内部方案	1540	4	192	rGrG+G	1	SSRTH	12	CF2 分钟 -42°C 下2分 钟)	1	是	Advanta ge	50	是	-
229	1	15	15	5	1:	内部方案	1946	3	214	rGrG+G	1	SSRTH	12	42°C 下90	1	是	Advanta ge	50	是	-

[0168]

230	1	15	15	5	1:	内部方案	1620	2100	rGrG+G	1	SSRTH	12	分钟,接着10×(50°C下2分钟)	1	是	Advantage	50	是	-
231	1	15	15	5	1:	内部方案	1724	2059	rGrG+G	1	SSRTH	12	分钟,接着10×(50°C下2分钟)	1	是	Advantage	50	是	-

[0169]

232	1	15	15	5	1:	内部方案 (对于 oligo-dT 没有 72°C 下的变性步骤 (在室温下温育 5 分钟))	1355	181	3	rGrG+G	1	SSRTH	12	42°C 下 2 分钟, 接着 10× (50°C 下 2 分钟) -42°C 下 2 分钟	1	是	Advanta ge	50	-	-
233	1	15	15	5	1:	内部方案 (对于 oligo-dT 没有 72°C 下的变性步骤 (在室温下温育 5 分钟))	1330	181	0	rGrG+G	1	SSRTH	12	42°C 下 2 分钟, 接着 10× (50°C 下 2 分钟) -42°C 下 2 分钟	1	是	Advanta ge	50	-	-
234	1	15	15	5	1:	内部方案 (对于 oligo-dT 没有 72°C 下的变性步骤 (在室温下温育 5 分钟))	1319	179	5	rGrG+G	1	SSRTH	12	42°C 下 2 分钟, 接着 10× (50°C 下 2 分钟) -42°C 下 2 分钟	1	是	Advanta ge	50	-	-

[0170]

235	1	15	15	15	1	184	2	rGrG+G	1	SSRTH	12	(50° CF2 分钟 -42°C 下2分 钟)	Advanta ge	50	是	-
												42°C 下90 分钟, 接着 10× (50° CF2 分钟 -42°C 下2分 钟)				
236	1	15	15	15	1	179	2	rGrG+G	1	SSRTH	12	(在室温下 温育5分钟)	Advanta ge	50	是	-
												内部方案 (对 于oligo-dT没 有在72°C下 的变性步骤 (在室温下 温育5分钟))				
												1: 5				

[0171]

237	1	15	15	1	5	1:	内部方案	1728	221	4	rGrG+G	1	SSRTH	12	42°C 下90 分钟， 接着 10× (50° CF2 分钟 -42°C 下2分 钟)	1	是	Advanta ge	50	是	-
238	1	15	15	1	5	1:	内部方案	1620	228	3	rGrG+G	1	SSRTH	12	42°C 下90 分钟， 接着 10× (50° CF2 分钟 -42°C 下2分 钟)	1	是	Advanta ge	50	是	-
239	1	15	15	1	5	1:	内部方案	1563	226	0	rGrG+G	1	SSRTH	12	42°C 下90 分钟， 接着 10× (50° CF2	1	是	Advanta ge	50	是	-

[0172]

240	1	15	15	5	1:	内部方案	1485	217	1	rGrG+G	1	SSRTII	12	分钟 -42℃ 下2分 钟)	1	是	Advanta ge	50	是	-
241	1	15	15	5	1:	内部方案	1444	228	1	rGrG+G	1	SSRTII	12	分钟 -42℃ 下2分 钟)	1	是	Advanta ge	50	是	-
242	1	15	15	5	1:	内部方案	1308	223	1	rGrG+G	1	SSRTII	12	分钟, 下90 分钟,	1	是	Advanta ge	50	是	-

[0173]

243	1	15	15	5	1:	内部方案	1618	217 6	rGtG+G	1	SSRTH	12	接着 10× (55° C下2 分钟 -42°C 下2分 钟)	1	是	Advanta ge	50	是	-
244	1	15	15	5	1:	内部方案	1385	216 8	rGtG+G	1	SSRTH	12	接着 10× (60° C下2 分钟 -42°C 下2分 钟)	1	是	Advanta ge	50	是	-

[0174]

245	1	15	15	15	1:	5	内部方案	1588	217	3	rGrG+G	1	SSRTH	12	42°C 下90 分钟, 接着 10× (60° CF2 分钟 -42°C 下2分 钟)	1	是	Advanta ge	50	是	-
246	1	15	15	15	1:	5	内部方案	1332	209	6	rGrG+G	1	SSRTH	12	42°C 下90 分钟	1	是	Advanta ge	50	是	-
247	1	15	15	15	1:	5	内部方案	1376	205	4	rGrG+G	1	SSRTH	12	42°C 下90 分钟	1	是	Advanta ge	50	是	-
248	1	15	15	15	1:	5	内部方案	15	225	1	rGrG+G	1	Maxima H-	4	55°C 下90 分钟	-	是	Advanta ge	50	是	-
249	1	15	15	15	1:	5	内部方案	22	198	8	rGrG+G	1	Maxima H-	4	55°C 下90 分钟	-	是	Advanta ge	50	是	-
250	1	15	15	15	1:	5	内部方案	62	208	4	rGrG+G	1	Maxima H-	4	55°C 下90 分钟	1	是	Advanta ge	50	是	-
251	1	15	15	15	1:	5	内部方案	84	186	7	rGrG+G	1	Maxima H-	4	55°C	1	是	Advanta ge	50	是	-

[0175]

252	1	15	15	1: 5	内部方案 (+ 额外的 DTT)	633	206 5	rGrG+G	1	Maxima H-	4	下 90 分钟	-	是	Advantage	50	-
253					内部方案 (+ 额外的 DTT)	失败		rGrG+G	1	Maxima H-	4	下 90 分钟	-	是	Advantage	50	-
254					内部方案 (+ 额外的 DTT)	失败		rGrG+G	1	Maxima H-	4	下 90 分钟	1	是	Advantage	50	-
255					内部方案 (+ 额外的 DTT)	失败		rGrG+G	1	Maxima H-	12	下 90 分钟	1	是	Advantage	50	-
256	1	15	15	1: 5	内部方案 (+ 额外的 DTT)	80	193 3	rGrG+G	1	Maxima H-	12	下 90 分钟	1	是	Advantage	50	-
257	1	15	15	1: 5	内部方案 (+ 额外的 DTT)	634	217 7	rGrG+G	1	Maxima H-	4	下 90 分钟	-	是	Advantage	50	-
258	1	15	15	1: 5	内部方案 (+ 额外的 DTT)	684	219 5	rGrG+G	1	Maxima H-	4	下 90 分钟	-	是	Advantage	50	-
259	1	15	15	1: 5	内部方案 (+ 额外的 DTT)	1013	214 2	rGrG+G	1	Maxima H-	4	下 90 分钟	1	是	Advantage	50	-
260	1	15	15	1: 5	内部方案 (+ 额外的 DTT)	1195	210 0	rGrG+G	1	Maxima H-	4	下 90 分钟	1	是	Advantage	50	-

[0176]

261	1	15	15	1:5	内部方案 (+ 额外的DIT)	2192	185	8	rGrG+G	1	Maxima H-	12	50°C 下90 分钟	1	是	Advanta ge	50	是	-
262	1	15	15	1:5	内部方案 (+ 额外的DIT)	2209	183	7	rGrG+G	1	Maxima H-	12	50°C 下90 分钟	1	是	Advanta ge	50	是	-
263	1	15	15	1:5	内部方案 (无 额外的DIT)	647	211	7	rGrG+G	1	Maxima H-	4	50°C 下90 分钟	-	是	Advanta ge	50	是	-
264	1	15	15	1:5	内部方案 (无 额外的DIT)	613	214	7	rGrG+G	1	Maxima H-	4	50°C 下90 分钟	-	是	Advanta ge	50	是	-
265	1	15	15	1:5	内部方案	1442	198	9	rGrG+G	1	SSRTH	12	42°C 下90 分钟, 接着 10× (50° C下2 分钟 42°C 下2分 钟)	1	是	Advanta ge	50	是	-
266	1	15	15	1:5	内部方案	1496	210	5	rGrG+G	1	SSRTH	12	42°C 下90 分钟, 接着 10×	1	是	Advanta ge	50	是	-

[0178]

274	1	15	15	15	1:	5	内部方案	3359	266	2	rGrG+G	1	SSRTH	12	10 [×] (50° C下2 分钟 -42°C 下2分 钟)	1	-	Advanta ge	50	是	-
275	1	15	15	15	1:	5	内部方案	819	206	9	rGrG+G	1	Maxima H-	4	42°C 下90 分钟, 接着 10 [×] (50° C下2 分钟 -42°C 下2分 钟)	-	是	Advanta ge	50	是	-
276	1	15	15	15	1:	5	内部方案	737	220	2	rGrG+G	1	Maxima H-	4	50°C 下90 分钟	-	是	Advanta ge	50	是	-
277	1	15	15	15	1:	5	内部方案	1375	193	7	rGrG+G	1	Maxima H-	4	50°C 下90 分钟	1	是	Advanta ge	50	是	-
278	1	15	15	15	1:	5	内部方案	1426	200	8	rGrG+G	1	Maxima H-	4	50°C 下90 分钟	1	是	Advanta ge	50	是	-

[0179]

279	1	15	15	1:	5	内部方案	2773	184 8	rGrG+G	1	Maxima H-	12	分钟 50°C 下90 分钟	1	是	Advanta ge	50	是	-
280	1	15	15	1:	5	内部方案	2987	191 6	rGrG+G	1	Maxima H-	12	分钟 50°C 下90 分钟	1	是	Advanta ge	50	是	-
281	1	15	15	1:	5	内部方案	2155	226 6	rGrG+G	1	SSRTH	12	分钟 42°C 下90 分钟, 接着 10× (50° CF2 分钟 42°C 下2分 钟)	1	是	Advanta ge	50	是	-
282	1	15	15	1:	5	内部方案	2240	227 1	rGrG+G	1	SSRTH	12	分钟 42°C 下90 分钟, 接着 10× (50° CF2 分钟 42°C 下2分 钟)	1	是	Advanta ge	50	是	-

[0180]

283	1	15	15	1:5	内部方案	694	224	4	rGrG+G	1	SSRTH	6	42°C 下90 分钟， 接着 10× (50° CF2 分钟 -42°C 下2分 钟)	-	是	Advanta ge	50	是	1 M脯 氨酸
284	1	15	15	1:5	内部方案	682	236	1	rGrG+G	1	SSRTH	6	42°C 下90 分钟， 接着 10× (50° CF2 分钟 -42°C 下2分 钟)	-	是	Advanta ge	50	是	1 M脯 氨酸
285	1	15	15	1:5	内部方案	745	226	4	rGrG+G	1	SSRTH	6	42°C 下90 分钟， 接着 10× (50°	-	是	Advanta ge	50	是	1 M脯 氨酸

[0181]

286	1	15	15	5	1:	内部方案	766	231	1	rGrG+G	1	SSRTIII	12	CF2 分钟 -42°C 下2分 钟)	42°C 下90 分钟, 接着 10× (50° CF2 分钟 -42°C 下2分 钟)	-	是	Advanta ge	50	是	1 M脯 氨酸
287	1	15	15	5	1:	内部方案	685	230	4	rGrG+G	1	SSRTIII	12	CF2 分钟 -42°C 下2分 钟)	42°C 下90 分钟, 接着 10× (50° CF2 分钟 -42°C 下2分 钟)	-	是	Advanta ge	50	是	1 M脯 氨酸
288	1	15	15	5	1:	内部方案	642	222	6	rGrG+G	1	SSRTIII	12	42°C 下90	42°C 下90	-	是	Advanta ge	50	是	1 M脯 氨酸

[0182]

289	1	15	15	15	1:	5	内部方案	1133	187	3	rGtG+G	1	SSRTH	12	分钟，接着10×(50°C下2分钟)	1	是	Advanta	50	是			氨酸
290	1	15	15	15	1:	5	内部方案	1443	214	8	rGtG+G	1	SSRTH	12	分钟，接着10×(50°C下2分钟)	1	是	Advanta	50	是			

[0183]

291	1	15	15	5	1:	内部方案	1147	206	6	rGrG+G	1	SSRTH	12	下2分 钟) 42°C 下90 分钟, 接着 10× (50° C)下2 分钟 42°C 下2分 钟)	1	是	Advanta ge	50	是			
292	1	15	15	5	1:	内部方案	1322	208	4	rGrG+G	1	SSRTH	12	下2分 钟) 42°C 下90 分钟, 接着 10× (50° C)下2 分钟 42°C 下2分 钟)	1	是	Advanta ge	50	是			
293	1	15	15	5	1:	内部方案	1013	209	5	rGrG+G	1	SSRTH	12	下2分 钟) 42°C 下90 分钟, 接着 10×	1	是	Advanta ge	50	是			

[0184]

294	1	15	15	15	1	内部方案	960	212	5	rGrG+G	1	SSRTH	12	(50°C CF2 分钟 -42°C 下2分 钟) 42°C 下90 分钟, 接着 10× (50°C CF2 分钟 -42°C 下2分 钟)	1	是	Advanta ge	50	是	
295	1	15	15	15	1	内部方案, 使 用SMARTer dT30 (非锚定 oligo)	1296	212	9	rGrG+G	1	SSRTH	12	(50°C CF2 分钟 -42°C 下2分 钟) 42°C 下90 分钟, 接着 10× (50°C CF2 分钟 -42°C 下2分 钟)	1	是	Advanta ge	50	是	

[0185]

296	1	15	15	1	内部方案, 使用SMARTer dT30 (非锚定 oligo)	1390	4	219	rGtG+G	1	SSRTH	12	42°C 下90 分钟, 接着 10× (50° C)下2 分钟 -42°C 下2分 钟)	1	是	Advanta ge	50	是	
297	1	15	15	1	内部方案, 使用SMARTer dT30 (非锚定 oligo)	1419	4	208	rGtG+G	1	SSRTH	12	42°C 下90 分钟, 接着 10× (50° C)下2 分钟 -42°C 下2分 钟)	1	是	Advanta ge	50	是	
298	1	18	15	1	内部方案	5456	3	229	rGtG+G	2	SSRTH	12	42°C 下90 分钟, 接着 10× (50° C)下2 分钟	1	是	Advanta ge	50	是	

[0186]

299	1	18	15	20	1:	内部方案	5753	233	4	rGrG+G	2	SSRTH	12	分钟 -42℃ 下2分 钟)	1	是	Advanta ge	50	是	
														42℃ 下90 分钟, 接着 10× (50° CF2 分钟 -42℃ 下2分 钟)						
300	1	18	15	20	1:	内部方案	5341	236	5	rGrG+G	2	SSRTH	12	分钟 -42℃ 下2分 钟)	1	是	Advanta ge	50	是	
301	1	18	15	20	1:	内部方案	2266	175	0	rGrG+G	2	SSRTH	12	分钟; 下90 分钟;	1	是	Advanta ge	50	是	

[0187]

302	1	18	15	20	1:1	内部方案	1530	1850	rGrG+G	2	SSRTH	12	接着 10× (50° C下2 分钟 -42°C 下2分 钟)	1	是	Advanta ge	50	是
303	1	18	15	20	1:1	内部方案	1883	1703	rGrG+G	2	SSRTH	12	42°C 下90 分钟、 接着 10× (50° C下2 分钟 -42°C 下2分 钟)	1	是	Advanta ge	50	是

[0188]

304	1	18	15	1:	20	内部方案	2856	173	1	rGrG+G	2	SSRTH	12	42°C 下90 分钟, 接着 10× (50° C下2 分钟 -42°C 下2分 钟)	1	是	Advanta ge	50	是				
305	1	18	15	1:	20	内部方案	3150	237	1	rGrG+N	1	SSRTH	12	42°C 下90 分钟, 接着 10× (50° C下2 分钟 -42°C 下2分 钟)	1	是	Advanta ge	50	是				
306	1	18	15	1:	20	内部方案	2889	239	3	rGrG+N	1	SSRTH	12	42°C 下90 分钟, 接着 10× (50° C下2 分钟 -42°C 下2分 钟)	1	是	Advanta ge	50	是				

[0189]

307	1	18	15	20	1:	内部方案	3773	230	2	rGrG+N	2	SSRTH	12	CF2 分钟 -42°C F2分 钟) 42°C F90 分钟、 接着 10× (50° CF2 分钟 -42°C F2分 钟)	1	是	Advanta ge	50	是				
308	1	18	15	20	1:	内部方案	3744	231	8	rGrG+N	2	SSRTH	12	CF2 分钟 -42°C F2分 钟) 42°C F90 分钟、 接着 10× (50° CF2 分钟 -42°C F2分 钟)	1	是	Advanta ge	50	是				
309	1	18	15	20	1:	内部方案	4113	239	0	rGrG+N	2	SSRTH	12	42°C F90	1	是	Advanta ge	50	是				

[0190]

310	1	18	15	20	1:	内部方案	3903	230 9	rGrG+N	2	SSRTII	12	分钟,接着10×(50°C F2 分钟 -42°C 下2分钟)	1	是	Advantage	50	是
311	1	18	15	20	1:	内部方案	2649	243 6	rGrG+N	2	SSRTII	12	分钟,接着10×(50°C F2 分钟 -42°C 下2分钟)	1	是	Advantage	50	是

[0191]

312	1	18	15	1:	内部方案	2856	242	2	rGrG+N	2	SSRTH	12	F2分 钟) 42°C F90 分钟, 接着 10× (50° CF2 分钟 42°C F2分 钟)	1	是	Advanta ge	50	是				
313	1	18	15	1:	内部方案	2674	241	2	rGrG+N	2	SSRTH	12	F2分 钟) 42°C F90 分钟, 接着 10× (50° CF2 分钟 42°C F2分 钟)	1	是	Advanta ge	50	是				
314	1	18	15	1:	内部方案	2641	242	7	rGrG+N	2	SSRTH	12	42°C F90 分钟, 接着 10×	1	是	Advanta ge	50	是				

[0192]

315	1	18	15	20	1:	内部方案	5251	227	2	rGrG+G	2	SSRTH	12	(50°C F2 分钟, 42°C F2 分钟, 42°C F2 分钟, 接着 10× (50°C F2 分钟, 42°C F2 分钟, 42°C F2 分钟)	1	是	Advanta ge	50	是		
316	1	15	15	5	1:	内部方案	1255	205	7	rGrG+G	1	SSRTH	12	(50°C F2 分钟, 42°C F2 分钟, 42°C F2 分钟, 接着 10× (50°C F2 分钟, 42°C F2 分钟, 42°C F2 分钟)	1	-	KAPA HiFiHS	50	是		

[0193]

317	1	15	15	6	1:	内部方案	1135	212	3	rGrG+G	1	SSRTH	12	42°C 下90 分钟， 接着 10× (50° CF2 分钟 -42°C 下2分 钟)	1	-	KAPA HiFi HS	50	是	
318	1	15	15	7	1:	内部方案	925	222	4	rGrG+G	1	SSRTH	12	42°C 下90 分钟， 接着 10× (50° CF2 分钟 -42°C 下2分 钟)	1	-	KAPA HiFi HS	50	是	
319	1	15	15	8	1:	内部方案	790	232	6	rGrG+G	1	SSRTH	12	42°C 下90 分钟， 接着 10× (50° CF2 分钟 -42°C 下2分 钟)	1	-	KAPA HiFi HS	50	是	

[0194]

320	1	15	15	15	9	1:	内部方案	9	286	6	rGrG-G	1	SSRTH	12	分钟, 42°C 下 30 分钟, 50°C 下 10 分钟, 55°C 下 10 分钟	1	-	KAPA HiFi HS	50	是	1 M 山梨糖醇 + 0.3 M 海藻糖
321	1	15	15	15	10	1:	内部方案	17	264	8	rGrG-G	1	SSRTH	12	分钟, 42°C 下 30 分钟, 50°C 下 10 分钟, 55°C 下 10 分钟	1	-	KAPA HiFi HS	50	是	1 M 山梨糖醇 + 0.3 M 海藻糖
322	1	15	15	15	11	1:	内部方案	18	274	4	rGrG-G	1	SSRTH	12	分钟, 42°C 下 30 分钟, 50°C 下 10 分钟, 55°C 下 10 分钟	1	-	KAPA HiFi HS	50	是	1 M 山梨糖醇 + 0.3 M 海藻糖

[0195]

323	1	15	15	12	1:	内部方案	14	284	4	rGrG+G	1	SSRTII	12	下10 分钟	1	-	KAPA HiFi HS	50	是	1 M山 梨糖 醇 + 0.3 M 海藻 糖
														42°C 下30 分钟, 50°C 下10 分钟, 55°C						
324	1	15	15	13	1:	内部方案	24	254	6	rGrG+G	1	SSRTII	12	下10 分钟	1	-	KAPA HiFi HS	50	是	0.75 M山 梨糖 醇 + 0.15 M海 藻糖
														42°C 下30 分钟, 50°C 下10 分钟, 55°C						
325	1	15	15	14	1:	内部方案	30	247	8	rGrG+G	1	SSRTII	12	下10 分钟	1	-	KAPA HiFi HS	50	是	0.75 M山 梨糖 醇 + 0.15 M海 藻糖
														42°C 下30 分钟, 50°C 下10 分钟, 55°C						

[0196]

326	1	15	15	15	1:	内部方案	40	260	9	rGrG+G	1	SSRTH	12	42°C 下30 分钟, 50°C 下10 分钟, 55°C 下10 分钟	1	-	KAPA HiFi HS	50	是	0.75 M山 梨糖 醇 + 0.15 M海 藻糖
327	1	18	15	10	1:	内部方案	3197	206	1	rGrG+G	1	SSRTH	15	42°C 下90 分钟, 接着 10× (50° CF2 分钟 -42°C 下2分 钟)	1	-	KAPA HiFi HS	50	是	
328	1	18	15	10	1:	内部方案	3085	206	5	rGrG+G	1	SSRTH	15	42°C 下90 分钟, 接着 10× (50° CF2 分钟 -42°C	1	-	KAPA HiFi HS	50	是	

[0197]

329	1	18	15	10	1:1	内部方案	2627	2134	rGrG+G	1	SSRTH	15	下2分钟) 42°C 下90分钟, 接着 10× (50° CF2 分钟 42°C 下2分钟)	1	-	KAPA HIFI HS	50	是				
330	1	18	15	10	1:1	内部方案	2750	2035	rGrG+G	1	SSRTH	15	下2分钟) 42°C 下90分钟, 接着 10× (50° CF2 分钟 42°C 下2分钟)	1	-	KAPA HIFI HS	50	是				
331	1	18	15	10	1:1	内部方案	980	1920	rGrG+G	1	SSRTH	3	下2分钟) 42°C 下90分钟, 接着 10×	1	-	KAPA HIFI HS	50	是				

[0198]

332	1	18	15	10	1:	内部方案	997	186 3	rGrG+G	1	SSRTH	3	(50°C CF2 分钟 42°C 下2分 钟)	1	-	KAPA HiFi HS	50	是	
333	1	18	15	10	1:	内部方案	1055	192 5	rGrG+G	1	SSRTH	3	(50°C CF2 分钟 42°C 下2分 钟)	1	-	KAPA HiFi HS	50	是	

[0199]

334	1	18	15	10	1:	内部方案	938	193	1	rGtG+G	1	SSRTH	3	42°C 下90 分钟， 接着 10× (50° CF2 分钟 -42°C 下2分 钟)	1	-	KAPA HiFi HS	50	是	
335	1	18	15	10	1:	内部方案	2192	211	9	rGtG+G	1	SSRTH	6	42°C 下90 分钟， 接着 10× (50° CF2 分钟 -42°C 下2分 钟)	1	-	KAPA HiFi HS	50	是	
336	1	18	15	10	1:	内部方案	2122	204	6	rGtG+G	1	SSRTH	6	42°C 下90 分钟， 接着 10× (50° CF2	1	-	KAPA HiFi HS	50	是	

[0200]

337	1	18	15	10	1:1	内部方案	2408	207	9	rGrG+G	1	SSRTH	6	42℃ 下2分 钟) 42℃ 下90 分钟, 接着 10× (50° C)下2 分钟 42℃ 下2分 钟)	1	-	KAPA HiFi HS	50	是	
338	1	18	15	10	1:1	内部方案	1836	210	9	rGrG+G	1	SSRTH	6	42℃ 下2分 钟) 42℃ 下90 分钟, 接着 10× (50° C)下2 分钟 42℃ 下2分 钟)	1	-	KAPA HiFi HS	50	是	
339	1	18	15	10	1:1	内部方案	2861	209	8	rGrG+G	1	SSRTH	9	42℃ 下90 分钟,	1	-	KAPA HiFi HS	50	是	

[0202]

342	1	18	15	10	1:	内部方案	2553	216	8	rGrG+G	1	SSRTH	9	42°C 下90 分钟, 接着 10× (50° CF2 分钟 -42°C 下2分 钟)	1	-	KAPA HiFi HS	50	是				
343	1	18	15	10	1:	内部方案	2571	213	4	rGrG+G	1	SSRTH	12	42°C 下90 分钟, 接着 10× (50° CF2 分钟 -42°C 下2分 钟)	1	-	KAPA HiFi HS	50	是				
344	1	18	15	10	1:	内部方案	2691	211	5	rGrG+G	1	SSRTH	12	42°C 下90 分钟, 接着 10× (50° CF2 分钟 -42°C 下2分 钟)	1	-	KAPA HiFi HS	50	是				

[0203]

345	1	18	15	10	1:	内部方案	2348	212	1	rGtG+G	1	SSRTH	12	CF2 分钟 -42°C F2分 钟) 42°C F90 分钟, 接着 10× (50° CF2 分钟 -42°C F2分 钟)	1	-	KAPA HIFI HS	50	是			
346	1	18	15	10	1:	内部方案	2046	216	2	rGtG+G	1	SSRTH	12	CF2 分钟 -42°C F2分 钟) 42°C F90 分钟, 接着 10× (50° CF2 分钟 -42°C F2分 钟)	1	-	KAPA HIFI HS	50	是			
347	1	15	15	5	1:	内部方案	37	191	8	rGtG+G	1	SSRTH	3	42°C F90	1	-	KAPA HIFI HS	25	是			

[0204]

348	1	15	15	5	1:	内部方案	65	188	8	rG+G+G	1	SSRTH	3	分钟,接着10×(50°C F2 分钟 -42°C F2分钟)	1	-	KAPA HIFI HS	25	是	
349	1	15	15	5	1:	内部方案	46	197	6	rG+G+G	1	SSRTH	3	分钟,接着10×(50°C F2 分钟 -42°C F2分钟)	1	-	KAPA HIFI HS	25	是	

[0205]

350	1	15	15	5	1:1	内部方案	39	196	6	rGrG+G	1	SSRTH	3	下2分 钟) 42°C 下90 分钟, 接着 10× (50° CF2 分钟 42°C 下2分 钟)	1	-	KAPA HiFi HS	25	是	
351	1	15	15	5	1:1	内部方案	44	178	4	rGrG+G	1	SSRTH	3	下2分 钟) 42°C 下90 分钟, 接着 10× (50° CF2 分钟 42°C 下2分 钟)	1	-	KAPA HiFi HS	25	是	
352	1	15	15	5	1:1	内部方案	95	179	1	rGrG+G	1	SSRTH	3	下2分 钟) 42°C 下90 分钟, 接着 10×	1	-	KAPA HiFi HS	25	是	

[0206]

353	1	15	15	15	1:	内部方案	80	189 7	rGrG+G	1	SSRTH	3	(50°C F2 分钟 -42°C F2 分钟) 42°C F90 分钟, 接着 10× (50°C F2 分钟 -42°C F2 分钟)	1	-	KAPA HiFi HS	25	是	
354	1	15	15	15	1:	内部方案	281	168 5	rGrG+G	1	SSRTH	6	(50°C F2 分钟 -42°C F2 分钟) 42°C F90 分钟, 接着 10× (50°C F2 分钟 -42°C F2 分钟)	1	-	KAPA HiFi HS	25	是	

[0207]

355	1	15	15	1	1	内部方案	348	175	3	rGrG+G	1	SSRTH	6	42°C 下90 分钟, 接着 10× (50° C)下2 分钟	1	-	KAPA HiFi HS	25	是	
356	1	15	15	15	5	内部方案	204	173	4	rGrG+G	1	SSRTH	6	42°C 下90 分钟, 接着 10× (50° C)下2 分钟	1	-	KAPA HiFi HS	25	是	
357	1	15	15	15	5	内部方案	210	184	0	rGrG+G	1	SSRTH	6	42°C 下90 分钟, 接着 10× (50° C)下2 分钟	1	-	KAPA HiFi HS	25	是	

[0208]

358	1	15	15	5	1:	内部方案	207	185	3	rGrG+G	1	SSRTH	6	42°C 下90 分钟, 接着 10× (50° C下2 分钟 -42°C 下2分 钟)	1	-	KAPA HiFi HS	25	是		
359	1	15	15	5	1:	内部方案	285	180	1	rGrG+G	1	SSRTH	6	42°C 下90 分钟, 接着 10× (50° C下2 分钟 -42°C 下2分 钟)	1	-	KAPA HiFi HS	25	是		
360	1	15	15	5	1:	内部方案	120	194	2	rGrG+G	1	SSRTH	6	42°C 下90 分钟,	1	-	KAPA HiFi HS	25	是		

[0210]

363	1	15	15	5	1:	内部方案	558	188	7	rG+G	1	SSRTH	9	42°C 下90 分钟， 接着 10× (50° CF2 分钟 -42°C 下2分 钟)	1	-	KAPA HiFi HS	25	是	
364	1	15	15	5	1:	内部方案	429	179	2	rG+G	1	SSRTH	9	42°C 下90 分钟， 接着 10× (50° CF2 分钟 -42°C 下2分 钟)	1	-	KAPA HiFi HS	25	是	
365	1	15	15	5	1:	内部方案	340	177	9	rG+G	1	SSRTH	9	42°C 下90 分钟， 接着 10× (50°	1	-	KAPA HiFi HS	25	是	

[0212]

369	1	15	15	5	1:	内部方案	333	1840	rGrG+G	1	SSRTH	9	分钟,接着10×(50°C下2分钟)-42°C下2分钟)	1	-	KAPA HiFiHS	25	是	
370	1	15	15	5	1:	内部方案	477	1818	rGrG+G	1	SSRTH	12	分钟,接着10×(50°C下2分钟)-42°C下2分钟)	1	-	KAPA HiFiHS	25	是	

[0213]

371	1	15	15	5	1:	内部方案	547	175	4	rGrG+G	1	SSRTH	12	下2分 钟) 42°C 下90 分钟, 接着 10× (50° C)F2 分钟 42°C 下2分 钟)	1	-	KAPA HiFi HS	25	是
372	1	15	15	5	1:	内部方案	265	191	7	rGrG+G	1	SSRTH	12	下2分 钟) 42°C 下90 分钟, 接着 10× (50° C)F2 分钟 42°C 下2分 钟)	1	-	KAPA HiFi HS	25	是
373	1	15	15	5	1:	内部方案	349	181	5	rGrG+G	1	SSRTH	12	下2分 钟) 42°C 下90 分钟, 接着 10×	1	-	KAPA HiFi HS	25	是

[0215]

376	1	15	15	1:	内部方案	387	181	6	rGrG+G	1	SSRTH	12	42°C 下90 分钟， 接着 10× (50° C)下2 分钟 -42°C 下2分 钟)	1	-	KAPA HiFi HS	25	是	
377	1	15	15	1:	内部方案	635	192	8	rGrG+G	1	SSRTH	15	42°C 下90 分钟， 接着 10× (50° C)下2 分钟 -42°C 下2分 钟)	1	-	KAPA HiFi HS	25	是	
378	1	15	15	1:	内部方案	515	187	3	rGrG+G	1	SSRTH	15	42°C 下90 分钟， 接着 10× (50° C)下2 分钟	1	-	KAPA HiFi HS	25	是	

[0219]

387	1	15	15	5	1:	内部方案	1160	173	6	rGrG+G	1	SSRTH	20	CF2 分钟 -42°C 下2分 钟)	42°C 下90 分钟, 接着 10× (50° CF2 分钟 -42°C 下2分 钟)	1	-	KAPA HIFI HS	25	是				
388	1	15	15	5	1:	内部方案	1245	178	6	rGrG+G	1	SSRTH	20	CF2 分钟 -42°C 下2分 钟)	42°C 下90 分钟, 接着 10× (50° CF2 分钟 -42°C 下2分 钟)	1	-	KAPA HIFI HS	25	是				
389	1	15	15	5	1:	内部方案	1234	173	3	rGrG+G	1	SSRTH	25	42°C 下90	42°C 下90	1	-	KAPA HIFI HS	25	是				

[0221]

392	1	15	15	5	1:1	内部方案	1713	159	6	rGrG+G	1	SSRTIII	25	下2分 钟) 42°C 下90 分钟, 接着 10× (50° C下2 分钟 42°C 下2分 钟)	1	-	KAPA HiFi HS	25	是	
393	1	15	15	5	1:1	内部方案	1428	166	7	rGrG+G	1	SSRTIII	30	下2分 钟) 42°C 下90 分钟, 接着 10× (50° C下2 分钟 42°C 下2分 钟)	1	-	KAPA HiFi HS	25	是	
394	1	15	15	5	1:1	内部方案	1274	171	1	rGrG+G	1	SSRTIII	30	下2分 钟) 42°C 下90 分钟, 接着 10×	1	-	KAPA HiFi HS	25	是	

[0223]

397	1	15	15	5	1:	内部方案	86	199	6	rGrG+G	1	SSRTH	6	42°C 下90 分钟， 接着 10× (50° C)F2 分钟 -42°C 下2分 钟)	1	-	KAPA HiFiHS	25	是	
398	1	15	15	5	1:	内部方案	66	200	2	rGrG+G	1	SSRTH	6	42°C 下90 分钟， 接着 10× (50° C)F2 分钟 -42°C 下2分 钟)	1	-	KAPA HiFiHS	25	是	
399	1	15	15	5	1:	内部方案	92	194	1	rGrG+G	1	SSRTH	6	42°C 下90 分钟， 接着 10× (50° C)F2	1	-	KAPA HiFiHS	25	是	

[0226]

405	1	15	15	5	1:	内部方案	132	208 8	rGrG+G	1	SSRTIII	12	42°C 下90 分钟, 接着 10× (50° CF2 分钟 -42°C 下2分 钟)	1	-	KAPA HiFi HS	25	是			
406	1	15	15	5	1:	内部方案	101	213 9	rGrG+G	1	SSRTIII	12	42°C 下90 分钟, 接着 10× (50° CF2 分钟 -42°C 下2分 钟)	1	-	KAPA HiFi HS	25	是			
407	1	15	15	5	1:	内部方案	131	222 1	rGrG+G	1	SSRTIII	12	42°C 下90 分钟, 接着 10× (50°	1	-	KAPA HiFi HS	25	是			

[0228]

411	1	15	15	5	1:	内部方案	141	204	2	rGrG+G	1	SSRTH	15	分钟,接着10×(50°C)F2分钟-42°C下2分钟)	1	-	KAPA HIFI HS	25	是	
412	1	15	15	5	1:	内部方案	196	207	7	rGrG+G	1	SSRTH	15	分钟,接着10×(50°C)F2分钟-42°C下2分钟)	1	-	KAPA HIFI HS	25	是	

[0231]

418	1	15	15	1:	5	内部方案	255	250	5	rGrG+G	1	SSRTH	6	42°C 下90 分钟， 接着 10× (50° C)F2 分钟 -42°C 下2分 钟)	-	-	KAPA HiFi HS	25	是	
419	1	15	15	1:	5	内部方案	231	249	3	rGrG+G	1	SSRTH	6	42°C 下90 分钟， 接着 10× (50° C)F2 分钟 -42°C 下2分 钟)	-	-	KAPA HiFi HS	25	是	
420	1	15	15	1:	5	内部方案	258	246	9	rGrG+G	1	SSRTH	6	42°C 下90 分钟， 接着 10× (50° C)F2	-	-	KAPA HiFi HS	25	是	

[0232]

421	1	15	15	5	1:	内部方案	226	252	9	rGrG+G	1	SSRTH	6	分钟 -42°C 下2分 钟)	-	-	KAPA HiFi HS	25	是				
422	1	15	15	5	1:	内部方案	280	240	2	rGrG+G	1	SSRTH	6	分钟 -42°C 下2分 钟, 接着 10× (50° CF2 分钟 -42°C 下2分 钟)	-	-	KAPA HiFi HS	25	是				
423	1	15	15	5	1:	内部方案	270	244	9	rGrG+G	1	SSRTH	6	分钟 -42°C 下90 分钟,	-	-	KAPA HiFi HS	25	是				

[0234]

426	1	15	15	5	1:	内部方案	433	253	7	rGrG+G	1	SSRTH	9	42°C 下90 分钟， 接着 10× (50° CF2 分钟 42°C 下2分 钟)	-	-	KAPA HiFi HS	25	是	
427	1	15	15	5	1:	内部方案	504	257	1	rGrG+G	1	SSRTH	9	42°C 下90 分钟， 接着 10× (50° CF2 分钟 42°C 下2分 钟)	-	-	KAPA HiFi HS	25	是	
428	1	15	15	5	1:	内部方案	483	200	2	rGrG+G	1	SSRTH	9	42°C 下90 分钟， 接着 10× (50°	-	-	KAPA HiFi HS	25	是	

[0236]

432	1	15	15	5	1:	内部方案	554	5	255	rGrG+G	1	SSRTH	9	分钟,接着10×(50°C下2分钟)-42°C下2分钟	-	-	KAPA HIFIHS	25	是	
433	1	15	15	5	1:	内部方案	677	8	236	rGrG+G	1	SSRTH	12	分钟,接着10×(50°C下2分钟)-42°C下2分钟	-	-	KAPA HIFIHS	25	是	

[0239]

439	1	15	15	1:	5	内部方案	41	253	6	rGrG+G	1	SSRTII	6	42°C 下90 分钟, 接着 10× (50° C)F2 分钟 42°C 下2分 钟)	-	-	KAPA HiFi HS	25	是	
440	1	15	15	1:	5	内部方案	28	264	6	rGrG+G	1	SSRTII	6	42°C 下90 分钟, 接着 10× (50° C)F2 分钟 42°C 下2分 钟)	-	-	KAPA HiFi HS	25	是	
441	1	15	15	1:	5	内部方案	44	270	2	rGrG+G	1	SSRTII	6	42°C 下90 分钟, 接着 10× (50° C)F2	-	-	KAPA HiFi HS	25	是	

[0242]

447	1	15	15	5	1:	内部方案	122	237	4	rGrG+G	1	SSRTH	12	42°C 下90 分钟, 接着 10× (50° CF2 分钟 -42°C 下2分 钟)	-	-	KAPA HiFi HS	25	是	
448	1	15	15	5	1:	内部方案	138	236	8	rGrG+G	1	SSRTH	12	42°C 下90 分钟, 接着 10× (50° CF2 分钟 -42°C 下2分 钟)	-	-	KAPA HiFi HS	25	是	
449	1	15	15	5	1:	内部方案	105	244	1	rGrG+G	1	SSRTH	12	42°C 下90 分钟, 接着 10× (50°	-	-	KAPA HiFi HS	25	是	

[0245]

455	1	15	15	5	1:	内部方案	128	200	7	rGrG+G	1	SSRTH	20	下2分 钟) 42°C 下90 分钟, 接着 10× (50° C)下2 分钟 42°C 下2分 钟)	-	-	KAPA HiFi HS	25	是	
456	1	15	15	5	1:	内部方案	86	210	4	rGrG+G	1	SSRTH	20	下2分 钟) 42°C 下90 分钟, 接着 10× (50° C)下2 分钟 42°C 下2分 钟)	-	-	KAPA HiFi HS	25	是	
457	1	15	15	5	1:	内部方案	98	214	7	rGrG+G	1	SSRTH	20	下2分 钟) 42°C 下90 分钟, 接着 10×	-	-	KAPA HiFi HS	25	是	

[0248]

TSO	ddC	rGrGrG	02	03	66.431 3	5 109.93 13	01 6.64E- 02	01 1.14E- 01	1770.5	1416.5	4
TSO	ddC	SMARTer Oligo II A	-	-	30.075	84.225	-	-	1463	1652	1
TSO	dGCGGG	dGCGGGp	2.63E- 03	1.00E- 01	47.306 7	14.253 3	9.78E- 04	1.00E- 01	2104.666 7	2309.3333	3
TSO	dGCGGG	rGrGrG	2.21E- 02	1.00E- 01	47.306 7	150.67 33	9.85E- 01	7.00E- 01	2104.666 7	2107.3333	3
TSO	dGCGGG	rGrGrGp	1.32E- 01	3.33E- 01	48.33	35.64	2.38E- 03	3.33E- 01	2117.5	2588.5	2
TSO	dGCGGGp	rGrGrG	1.37E- 02	1.00E- 01	14.253 3	150.67 33	2.41E- 01	1.00E- 01	2309.333 3	2107.3333	3
TSO	dGCGGGp	rGrGrGp	2.47E- 03	3.33E- 01	14.48	35.64	5.93E- 02	3.33E- 01	2317	2588.5	2
TSO	rGrG+G	磷酸盐	2.41E- 03	3.33E- 01	299.02 5	44.062 5	1.89E- 01	3.33E- 01	1707	1907	2
TSO	rGrG+G	rGrGrG	6.55E- 03	4.96E- 04	235.71 25	82.075	1.71E- 01	2.14E- 01	1588.833 3	1713	12
TSO	rGrG+G	SMARTer Oligo II A	2.74E- 01	3.33E- 01	197.66 25	77.175	5.20E- 02	3.33E- 01	1444	1622.5	2
TSO	rGrGrG	rGrGrGp	4.64E- 04	2.86E- 02	154.56 5	32.765	2.56E- 05	2.86E- 02	2256.5	2583.5	4
TSO	rGrGrG	SMARTer Oligo II A	1.62E- 01	3.33E- 01	106.01 25	77.175	4.67E- 01	6.67E- 01	1475.5	1622.5	2
MgCl2 浓 度 (mM)	0	3	5.27E- 01	4.00E- 01	65.95	82.975	9.97E- 01	1.00E+ 00	1588.666 7	1589	3
MgCl2 浓 度 (mM)	0	12	6.31E- 01	1.00E+ 00	75.337 5	107.21 25	7.78E- 01	1.00E+ 00	1511.5	1480	2

[0249]

MgCl2 浓度 (mM)	4	6		102.3	124.05	2.28E-01	3.33E-01	1517.5	1398	2
MgCl2 浓度 (mM)	4	9		102.3	211.875	5.08E-01	6.67E-01	1517.5	1563.5	2
MgCl2 浓度 (mM)	4	12		91.395	198.795	3.07E-01	2.47E-01	1918.8	1753.9	10
MgCl2 浓度 (mM)	4	15		102.3	130.875	3.81E-01	6.67E-01	1517.5	1360	2
MgCl2 浓度 (mM)	6	9		154.5938	178.1625	3.80E-03	2.86E-02	1390.75	1607	4
MgCl2 浓度 (mM)	6	12		127.0167	132.9417	4.77E-01	2.58E-01	1709.7778	1845.8889	9
MgCl2 浓度 (mM)	6	15		140.52	113.79	7.04E-01	5.48E-01	1443	1477	5
MgCl2 浓度 (mM)	9	12		178.1625	170.8125	8.05E-01	8.86E-01	1607	1582.25	4
MgCl2 浓度 (mM)	9	15		178.1625	124.7062	1.24E-01	2.08E-01	1607	1448	4
MgCl2 浓度 (mM)	12	15		170.8125	124.7062	2.87E-01	3.43E-01	1582.25	1448	4
甜菜碱浓度 (M)	0	0.6		80.6063	73.725	3.70E-02	1.14E-01	1690.75	1540.5	4
甜菜碱浓度 (M)	0	1		51.93	81.2025	3.55E-01	2.18E-01	2127.8	2006.9	10
甜菜碱浓度 (M)	0.6	1		87.1	69.875	7.58E-01	1.00E+00	1618.3333	1596.6667	3

[0250]

浓 度 (M)																		
甜菜碱 浓 度 (M)	1	1.5	7.73E- 01	3.43E- 01	101.21 5	86.115	8.82E- 01	6.86E- 01	2409.5	2430.5	4							
RT酶	Maxima H-	Revertaid Premium	1.92E- 02	3.33E- 01	192	15.637 5	1.66E- 01	3.33E- 01	1696	1603.5	2							
RT酶	Revertaid H-	SSRTH	2.47E- 02	4.11E- 02	148.21 25	222.37 5	9.03E- 02	1.32E- 01	1423	1552.8333	6							
RT酶	SMARTscrib c	SSRTH	-	-	15.9	19.65	-	-	1669	1683	1							
RT酶	SSRTH	SSRTH	1.21E- 06	1.55E- 04	252.30 94	9.7031	8.59E- 01	6.74E- 01	1637.125	1618.875	8							
RT方案	42°C F 60分 钟,接着60°C 下90分钟	50°C F 60分 钟,接着42°C 下90分钟	1.47E- 01	3.33E- 01	73.95	43.05	5.70E- 01	1.00E+ 00	1628	1577.5	2							
RT方案	42°C F 60分 钟,接着60°C 下90分钟	42°C F 90分 钟,60°C F 30 分钟,接着 42°C F 30分 钟	1.50E- 01	3.33E- 01	73.95	107.36 25	3.70E- 01	3.33E- 01	1628	1719	2							
RT方案	50°C F 60分 钟,接着42°C 下90分钟	42°C F 90分 钟,60°C F 30 分钟,接着 42°C F 30分 钟	5.90E- 02	2.00E- 01	55.743 7	110.73 75	1.58E- 01	1.46E- 01	1515	1629	4							
RT方案	42°C F 90分 钟	42°C F 90分 钟,接着10×	3.09E- 01	3.43E- 01	173.15 62	235.8	6.43E- 01	4.86E- 01	1877.5	1973	4							

[0251]

RT方案	42°C下90分钟	(50°C下2分钟-42°C下2分钟)	6.72E-02	3.33E-01	101.55	109.8375	1.90E-01	3.33E-01	2075	2226	2	
RT方案	42°C下90分钟	42°C下90分钟,接着10×(55°C下2分钟-42°C下2分钟)	8.90E-01	4.00E-01	158.45	170.475	6.57E-01	4.00E-01	1924.3333	2025.3333	3	
RT方案	42°C下90分钟	42°C下90分钟,接着15×(50°C下2分钟-42°C下2分钟)	4.30E-01	6.67E-01	244.7625	278.1375	6.57E-01	6.67E-01	1680	1644.5	2	
RT方案	42°C下90分钟	42°C下90分钟,接着20×(50°C下2分钟-42°C下2分钟)	8.51E-01	6.67E-01	244.7625	237.225	1.20E-01	3.33E-01	1680	1467	2	
RT方案	42°C下90分钟	42°C下90分钟,接着5×(50°C下2分钟-42°C下2分钟)	2.86E-01	3.33E-01	244.7625	297.7125	4.87E-01	6.67E-01	1680	1738.5	2	

[0252]

RT方案	42°C下90分钟,接着10×(50°C下2分钟-42°C下2分钟)	42°C下90分钟,接着10×(55°C下2分钟-42°C下2分钟)	5.04E-03	1.00E-01	165.37 5	105.92 5	5.96E-01	1.00E+00	2248.666 7	2227.6667	3
RT方案	42°C下90分钟,接着10×(50°C下2分钟-42°C下2分钟)	42°C下90分钟,接着10×(60°C下2分钟-42°C下2分钟)	5.23E-01	4.21E-01	206.29 5	175.17	9.27E-01	5.48E-01	2031.2	2015.4	5
RT方案	42°C下90分钟,接着10×(50°C下2分钟-42°C下2分钟)	42°C下90分钟,接着15×(50°C下2分钟-42°C下2分钟)	7.32E-01	1.00E+00	291.12 5	300.3	1.71E-01	2.00E-01	1722.333 3	1639.6667	3
RT方案	42°C下90分钟,接着10×(50°C下2分钟-42°C下2分钟)	42°C下90分钟,接着20×(50°C下2分钟-42°C下2分钟)	4.97E-01	4.00E-01	246.87 5	196.37 5	7.32E-02	1.00E-01	1714	1521	3
RT方案	42°C下90分钟,接着10×(50°C下2分钟-42°C下2分钟)	42°C下90分钟,接着5×(50°C下2分钟-42°C下2分钟)	9.92E-01	1.00E+00	291.12 5	291.25	5.65E-01	7.00E-01	1722.333 3	1752.6667	3
RT方案	42°C下90分钟,接着10×(55°C下2分钟)	42°C下90分钟,接着10×(60°C下2分钟)	2.69E-01	4.00E-01	105.92 5	114.77 5	2.23E-01	4.00E-01	2227.666 7	2172.3333	3

[0254]

RT方案	42°C下90分 钟,接着20分 (50°C下2分 钟-42°C下2 分钟)	42°C下90分 钟,接着5分 (50°C下2分 钟-42°C下2 分钟)	1.90E- 01	3.33E- 01	237.22 5	297.71 25	8.13E- 02	3.33E- 01	1467	1738.5	2
RT方案	50°C下90分 钟	55°C下90分 钟	3.50E- 03	7.94E- 03	62.595	12.24	2.09E- 01	1.51E- 01	2146.2	2051	5
RT方案	50°C下90分 钟	60°C下90分 钟	-	-	164.4	6	-	-	1858	1933	1
PCR酶	Advantage 2 聚合酶	KAPA HiFi HS	6.44E- 01	7.55E- 01	186.63 75	171.01 25	5.18E- 01	5.90E- 01	1929.416 7	2029.5	12
PCR酶	Advantage 2 聚合酶	Phusion HS	4.33E- 01	4.86E- 01	212.36 25	182.68 13	8.11E- 01	3.43E- 01	1701	1722.75	4
PCR酶	Advantage 2 聚合酶	Q5 NEB	5.85E- 02	2.86E- 02	212.36 25	133.85 62	6.29E- 01	3.43E- 01	1701	1743.75	4
PCR酶	KAPA HiFi HS	Phusion HS	2.60E- 01	3.43E- 01	223.72 5	182.68 13	7.49E- 01	8.86E- 01	1702	1722.75	4
PCR酶	KAPA HiFi HS	Q5 NEB	2.99E- 02	2.86E- 02	223.72 5	133.85 62	4.93E- 01	8.86E- 01	1702	1743.75	4
PCR酶	Phusion HS	Q5 NEB	1.25E- 01	1.14E- 01	182.68 13	133.85 62	5.99E- 01	8.86E- 01	1722.75	1743.75	4
纯化	0	是	6.77E- 01	6.05E- 01	186.85	203.22 5	3.44E- 01	3.87E- 01	2022.222 2	1875.4444	9
在开始 时添加 dNTP	0	是	4.55E- 03	1.37E- 02	193.67 81	134.38 12	3.44E- 04	5.55E- 05	1709.416 7	2008.0833	24
其他添 加剂	0	0.816 M 1,2 丙二醇	6.89E- 04	1.00E- 01	291.12 5	103.95	3.50E- 03	1.00E- 01	1722.333 3	1093	3
其他添	0	1.075 M 乙二	1.82E-	3.33E-	299.02	178.46	9.93E-	3.33E-	1707	1421.5	2

[0255]

加剂		醇	01	01	5	25	02	01			
其他添 加剂	0	3 mM MnCl ₂	1.10E- 01	3.33E- 01	56.535	28.095	1.13E- 01	3.33E- 01	1930	1479.5	2
其他添 加剂	0	6 mM MnCl ₂	1.05E- 01	3.33E- 01	56.535	16.95	1.03E- 01	3.33E- 01	1930	1213	2
其他添 加剂	0.3 M海藻糖	0.6 M海藻糖	8.18E- 01	6.86E- 01	77.062	72.356	4.45E- 01	4.86E- 01	1679	1634.25	4
其他添 加剂	0.816 M 1,2 丙二醇	1.075 M 乙二 醇	2.82E- 01	3.33E- 01	104.43	178.46	3.99E- 02	3.33E- 01	1095	1421.5	2
其他添 加剂	3 mM MnCl ₂	6 mM MnCl ₂	1.45E- 01	3.33E- 01	28.095	16.95	1.46E- 01	3.33E- 01	1479.5	1213	2

[0256]

表S2.所测试的所有模板转换寡核苷酸的列表。

TSO 名称	序列 (5'→3')	5'端阻断基团	5'端修饰	3'端修饰	3'端阻断基团
2OMe	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACtGr GrGmG	-	-	3核糖鸟苷+1鸟苷	2'-O-甲基
C6氨基	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACATr GrGrG	-	-	3核糖鸟苷	氨基连接臂C6
ddC	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACtGr GrGrGddC	-	-	4核糖鸟苷+1双脱氧胞嘧啶	-
dGCCGG G	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGC GGG	-	-	1鸟苷+1胞嘧啶+3鸟苷	-
dGCCGG Gp	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGC GGG	-	-	1鸟苷+1胞嘧啶+3鸟苷	磷酸盐
ISO	iGtCiGAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT ACtGrCiGrGrG	甲基C5	异鸟苷-异胞嘧啶-异鸟苷	1核糖鸟苷+1核糖胞嘧啶+3核糖鸟苷	磷酸盐
rGrGt+G	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACtGr G+G	-	-	2核糖鸟苷+1 LNA-修饰的鸟苷	-
rGrG+N	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACtGr G+N	-	-	2核糖鸟苷+1 LNA-修饰核苷酸 (任何)	-
+G+G+G	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTAC+G+ G	-	-	3 LNA-修饰鸟苷	-
rG+G+G	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACtG+ G	-	-	2 LNA-修饰鸟苷	-
rGrGrG	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACATr GrGrG	-	-	3核糖鸟苷	-
rG3p	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACATr GrGrGp	-	-	3核糖鸟苷	磷酸盐
rG5	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACtGr GrGrGrG	-	-	5核糖鸟苷	-

[0257]

样品	细胞类型	物种	浓度 (ng/ul)	平均大小 (bp)	TSO	TSO量 (10 ul RT反应液中10 uM溶液的ul)	RT酶	oligo dT	MgCl ₂ (mM)	甜菜碱 (M)	RT之后纯化?	PCR酶	PCR反应液体积 (ul)	备注
HEK_2	HEK 293T	智人 (<i>H.sapiens</i>)	10.778	1099	rGrG+G	1	SSRT II	SMARTer dT30VN	13	1	是	Advantage	50	可能是细胞聚集体
HEK_3	HEK 293T	智人	9.596	1142	rGrG+G	1	SSRT II	SMARTer dT30VN	14	1	是	Advantage	50	可能是细胞聚集体
HEK_4	HEK 293T	智人	1.160	1098	rGrG+G	1	SSRT II	SMARTer dT30VN	15	1	是	Advantage	50	
HEK_5	HEK 293T	智人	0.590	1203	rGrG+G	1	SSRT II	SMARTer dT30VN	16	1	是	Advantage	50	
HEK_6	HEK 293T	智人	2.210	1175	rGrG+G	1	SSRT II	SMARTer dT30VN	17	1	是	Advantage	50	
HEK_7	HEK 293T	智人	0.410	1136	rGrG+G	1	SSRT II	SMARTer dT30VN	18	1	是	Advantage	50	
HEK_8	HEK 293T	智人	4.184	1146	rGrG+G	1	SSRT II	SMARTer dT30VN	19	1	是	Advantage	50	可能是细胞聚集体
HEK_9	HEK 293T	智人	0.840	1141	rGrG+G	1	SSRT II	SMARTer dT30VN	20	1	是	Advantage	50	
HEK_10	HEK 293T	智人	1.130	1088	rGrG+G	1	SSRT II	SMARTer dT30VN	21	1	是	Advantage	50	
HEK_12	HEK 293T	智人	9.095	1106	rGrG+G	1	SSRT II	SMARTer dT30VN	23	1	是	Advantage	50	可能是细胞聚集体
HEK_13	HEK 293T	智人	0.410	1010	rGrG+G	1	SSRT II	SMARTer dT30VN	24	1	是	Advantage	50	

[0258]

	293T	90	17			II	dT30VN	4		ge	
HEK 14	HEK 293T	3.6	10			SSRT	SMARTer	2		Advanta	
		40	46		1	II	dT30VN	5	1	ge	可能是细胞聚集体
HEK 16	HEK 293T	17.	10			SSRT	SMARTer	2		Advanta	
		225	72		1	II	dT30VN	7	1	ge	可能是细胞聚集体
HEK_S MRT_1	HEK 293T	0.7	14			SMA	SMARTer			Advanta	
		60	29		1	RTsc ribe	dT30VN	6	1	ge	50
HEK_S MRT_2	HEK 293T	2.3	14			SMA	SMARTer			Advanta	
		04	11		1	RTsc ribe	dT30VN	6	1	ge	可能是细胞聚集体
HEK_S MRT_3	HEK 293T	1.5	14			SMA	SMARTer			Advanta	
		44	24		1	RTsc ribe	dT30VN	6	1	ge	50
HEK_S MRT_4	HEK 293T	0.4	14			SMA	SMARTer			Advanta	
		22	57		1	RTsc ribe	dT30VN	6	1	ge	50
HEK 18	HEK 293T	0.2	13			SSRT	SMARTer	1		Advanta	
		08	84		1	II	dT30VN	2	1	ge	40u SSRT II
HEK 19	HEK 293T	0.5	15			SSRT	SMARTer	1		Advanta	
		12	41		1	II	dT30VN	2	1	ge	40u SSRT II
HEK 20	HEK 293T	0.5	16			SSRT	SMARTer	1		Advanta	
		50	14		1	II	dT30VN	2	1	ge	40u SSRT II
HEK 21	HEK 293T	0.2	14			SSRT	SMARTer	1		Advanta	
		40	92		1	II	dT30VN	2	1	ge	40u SSRT II
HEK 22	HEK 293T	0.9	12			SSRT	SMARTer	1		Advanta	
		57	22		1	II	dT30VN	2	1	ge	40u SSRT II
HEK 23	HEK 293T	0.8	13			SSRT	SMARTer	1		Advanta	
		72	92		1	II	dT30VN	2	1	ge	40u SSRT II
HEK 24	HEK 293T	0.3	13			SSRT	SMARTer	1		Advanta	
		15	26		1	II	dT30VN	2	1	ge	40u SSRT II

[0259]

HEK 25	HEK 293T	智人	0.4	62	74	14	rGrG+G	1	SSRT II	SMARTer	1	2	1	是	Advanta ge	50
HEK 26	HEK 293T	智人	0.2	48	41	14	rGrG+G	1	SSRT II	SMARTer	1	2	1	是	Advanta ge	50
HEK 27	HEK 293T	智人	0.2	44	87	14	rGrG+G	1	SSRT II	SMARTer	1	2	1	是	Advanta ge	50
HEK 28	HEK 293T	智人	0.2	62	96	14	rGrG+G	1	SSRT II	SMARTer	1	2	1	是	Advanta ge	50
HEK 29	HEK 293T	智人	0.7	61	02	14	rGrG+G	1	SSRT II	SMARTer	1	2	1	是	Advanta ge	50
HEK 31	HEK 293T	智人	0.5	94	83	15	rGrG+G	1	SSRT II	SMARTer	1	2	1	是	Advanta ge	50
HEK 32	HEK 293T	智人	0.4	57	47	13	rGrG+G	1	SSRT II	SMARTer	1	2	1	是	Advanta ge	50
HEK 33	HEK 293T	智人	0.4	73	07	15	rGrG+G	1	SSRT II	SMARTer	1	2	1	是	Advanta ge	50
HEK 34	HEK 293T	智人	0.3	15	01	15	rGrG+G	1	SSRT II	SMARTer	1	2	1	是	Advanta ge	50
HEK 35	HEK 293T	智人	0.7	44	17	19	rGrG+G	1	SSRT II	SMARTer	1	2	1	-	Advanta ge	50
HEK 37	HEK 293T	智人	1.5	31	26	16	rGrG+G	1	SSRT II	SMARTer	1	2	1	-	Advanta ge	50
HEK 38	HEK 293T	智人	0.3	44	70	18	rGrG+G	1	SSRT II	SMARTer	1	2	1	-	Advanta ge	50
HEK 39	HEK 293T	智人	0.4	53	68	19	rGrG+G	1	SSRT II	SMARTer	1	2	1	-	Advanta ge	50
HEK 40	HEK 293T	智人	0.5	80	58	19	rGrG+G	1	SSRT II	SMARTer	1	2	1	-	Advanta ge	50
HEK 41	HEK 293T	智人	0.3	82	02	12	rGrG+G	1	SSRT II	SMARTer	1	2	1	是	Advanta ge	50
HEK 42	HEK	智人	0.3	12	12	12	rGrG+G	1	SSRT	SMARTer	1	1	1	是	Advanta ge	50

[0260]

	293T	HEK	92	88		II	dT30VN	2		ge	
HEK 43	HEK 293T	智人	0.8 44	13 19	rGrG+G	1	SSRT II	1	是	Advanta ge	50
HEK 44	HEK 293T	智人	0.5 82	14 52	rGrG+G	1	SSRT II	1	是	Advanta ge	50
HEK 45	HEK 293T	智人	0.6 82	13 12	rGrG+G	1	SSRT II	1	是	Advanta ge	50
HEK 46	HEK 293T	智人	0.6 92	14 11	rGrG+G	1	SSRT II	1	是	Advanta ge	50
HEK 47	HEK 293T	智人	0.7 16	13 37	rGrGrG	1	SSRT II	1	是	Advanta ge	50
HEK 48	HEK 293T	智人	0.5 78	13 91	rGrGrG	1	SSRT II	1	是	Advanta ge	50
HEK 49	HEK 293T	智人	2.6 81	14 40	rGrGrG	1	SSRT II	1	是	Advanta ge	50
HEK 50	HEK 293T	智人	1.1 58	15 07	rGrGrG	1	SSRT II	1	是	Advanta ge	50
HEK 51	HEK 293T	智人	0.7 10	13 89	rGrGrG	1	SSRT II	1	是	Advanta ge	50
HEK 52	HEK 293T	智人	1.0 50	14 63	rGrGrG	1	SSRT II	1	是	Advanta ge	50
HEK 53	HEK 293T	智人	0.7 14	13 84	rGrGrG	1	SSRT II	1	是	Advanta ge	50
HEK 54	HEK 293T	智人	0.6 37	15 09	rGrGrG	1	SSRT II	1	是	Advanta ge	50
HEK 55	HEK 293T	智人	1.3 38	18 73	rGrGrG	1	SSRT II	1	-	KAPA HiFi HS	50
HEK 56	HEK 293T	智人	1.2 58	18 46	rGrGrG	1	SSRT II	1	-	KAPA HiFi HS	50
HEK 57	HEK 293T	智人	3.0 12	17 98	rGrG+G	1	SSRT II	1	-	KAPA HiFi HS	50

[0261]

HEK 58	HEK 293T	智人	1.7	63	17	34			SSRT II	SMARTer dt30VN	1	1	-	KAPA HiFi HS	50
HEK 59	HEK 293T	智人	2.8	37	18	33		rGrG+G	SSRT II	SMARTer dt30VN	1	1	-	Advanta ge	50
HEK 60	HEK 293T	智人	1.8	89	17	58		rGrG+G	SSRT II	SMARTer dt30VN	1	1	-	Advanta ge	50
HEK 61	HEK 293T	智人	3.7	33	18	41		rGrG+G	SSRT II	SMARTer dt30VN	1	1	-	Advanta ge	50
HEK 62	HEK 293T	智人	2.4	30	18	49		rGrG+G	SSRT II	SMARTer dt30VN	1	1	-	Advanta ge	50
HEK 63	HEK 293T	智人	0.7	58	18	45		rGrG+G	SSRT II	SMARTer dt30VN	1	1	-	KAPA HiFi HS	50
HEK 64	HEK 293T	智人	0.9	48	19	07		rGrG+G	SSRT II	SMARTer dt30VN	1	1	-	KAPA HiFi HS	50
HEK 65	HEK 293T	智人	1.3	64	18	37		rGrG+G	SSRT II	SMARTer dt30VN	1	1	-	KAPA HiFi HS	50
HEK 66	HEK 293T	智人	1.8	97	18	21		rGrG+G	SSRT II	SMARTer dt30VN	1	1	-	KAPA HiFi HS	50
HEK 67	HEK 293T	智人	2.7	21	17	46		rGrG+G	SSRT II	SMARTer dt30VN	1	1	-	KAPA HiFi HS	50
HEK 68	HEK 293T	智人	5.1	23	16	99		rGrG+G	SSRT II	SMARTer dt30VN	1	1	-	KAPA HiFi HS	50
HEK 69	HEK 293T	智人	2.4	99	18	92		rGrG+G	SSRT II	SMARTer dt30VN	1	1	-	KAPA HiFi HS	50
HEK 70	HEK 293T	智人	1.6	32	17	15		rGrG+G	SSRT II	SMARTer dt30VN	1	1	-	KAPA HiFi HS	50
HEK 71	HEK 293T	智人	2.6	14	14	38		rGrG+G	SSRT II	SMARTer dt30VN	1	1	是	Advanta ge	50
HEK 72	HEK 293T	智人	1.3	43	15	35		rGrG+G	SSRT II	SMARTer dt30VN	1	1	是	Advanta ge	50
HEK 73	HEK 293T	智人	2.6	15	15	15		rGrG+G	SSRT II	SMARTer dt30VN	1	1	是	Advanta ge	50

可能是细胞聚集体

[0262]

	293T		18	70		II	dt30VN	2		ge	
HEK_74	HEK_293T	智人	2.0	16		SSRT	SMARTer	1		Advanta ge	
			37	11	1	II	dt30VN	2	1	是	50
HEK_75	HEK_293T	智人	1.8	14		SSRT	SMARTer	1		Advanta ge	
			62	94	1	II	dt30VN	2	1	是	50
HEK_76	HEK_293T	智人	0.5	15		SSRT	SMARTer	1		Advanta ge	
			60	67	1	II	dt30VN	2	1	是	50
HEK_77	HEK_293T	智人	1.6	16		SSRT	SMARTer	1		Advanta ge	
			09	04	1	II	dt30VN	2	1	是	50
HEK_78	HEK_293T	智人	0.7	13		SSRT	SMARTer	1		Advanta ge	
			48	92	1	II	dt30VN	2	1	是	50
HEK_79	HEK_293T	智人	2.8	20		SSRT	SMARTer	1		Advanta ge	
			76	93	1	II	dt30VN	2	1	-	50
HEK_80	HEK_293T	智人	6.0	19		SSRT	SMARTer	1		Advanta ge	可能是细胞聚集体
			17	75	1	II	dt30VN	2	1	-	50
HEK_81	HEK_293T	智人	5.1	18		SSRT	SMARTer	1		Advanta ge	可能是细胞聚集体
			10	34	1	II	dt30VN	2	1	-	50
HEK_82	HEK_293T	智人	2.6	19		SSRT	SMARTer	1		KAPA	
			59	12	1	II	dt30VN	2	1	-	50
HEK_83	HEK_293T	智人	3.8	18		SSRT	SMARTer	1		KAPA	可能是细胞聚集体
			20	48	1	II	dt30VN	2	1	-	50
HEK_84	HEK_293T	智人	1.8	19		SSRT	SMARTer	1		KAPA	
			75	41	1	II	dt30VN	2	1	-	50
HEK_85	HEK_293T	智人	4.4	20		SSRT	SMARTer	1		KAPA	可能是细胞聚集体
			77	03	1	II	dt30VN	2	1	-	50
HEK_86	HEK_293T	智人	4.1	17		SSRT	SMARTer	1		Advanta ge	可能是细胞聚集体
			62	84	1	II	dt30VN	2	1	-	50
HEK_87	HEK_293T	智人	0.5	19		Maxi ma H minu s					
			39	64	1		SMARTer dt30VN	2	1	-	50

[0263]

HEK 88	HEK 293T	智人	0.5 26	18 60	rGrG+G	1	Maxi ma H minu s	SMARTer dT30VN	1 2	-	KAPA HiFi HS	50	
HEK 89	HEK 293T	智人	0.2 88	18 81	rGrG+G	1	Maxi ma H minu s	SMARTer dT30VN	1 2	-	KAPA HiFi HS	50	
HEK 90	HEK 293T	智人	0.6 50	15 60	rGrG+G	1	Maxi ma H minu s	SMARTer dT30	1 2	-	KAPA HiFi HS	50	
HEK 91	HEK 293T	智人	0.3 41	18 52	rGrG+G	1	Maxi ma H minu s	SMARTer dT30	1 2	-	KAPA HiFi HS	50	
HEK 92	HEK 293T	智人	0.3 54	17 83	rGrG+G	1	Maxi ma H minu s	SMARTer dT30	1 2	-	KAPA HiFi HS	50	
HEK 93	HEK 293T	智人	1.5 20	19 39	rGrG+N	1	SSRT II	SMARTer dT30VN	1 2	-	KAPA HiFi HS	50	
HEK 94	HEK 293T	智人	1.7 22	17 40	rGrG+N	1	SSRT II	SMARTer dT30VN	1 2	-	KAPA HiFi HS	50	
HEK 95	HEK 293T	智人	0.4 85	17 40	rGrG+N	1	SSRT II	SMARTer dT30VN	1 2	-	KAPA HiFi HS	50	
HEK 96	HEK 293T	智人	1.0 90	18 33	rGrG+N	1	SSRT II	SMARTer dT30VN	1 2	-	KAPA HiFi HS	50	
HEK 97	HEK 293T	智人	2.8 56	17 31	rGrG+N	2	SSRT II	SMARTer dT30VN	1 2	-	KAPA HiFi HS	50	
HEK 98	HEK 293T	智人	2.7 18	18	rGrG+N	2	SSRT	SMARTer	1	-	KAPA	50	

[0264]

	293T	76	81		II	dT30VN	2		HiFi HS	
HEK_99	HEK	1.9	17		SSRT	SMARTer	1		KAPA	
HEK_100	HEK	54	30	智人	II	dT30VN	2	1	HiFi HS	50
HEK_101	HEK	2.8	19		SSRT	SMARTer	1		KAPA	
HEK_102	HEK	36	09	智人	II	dT30VN	2	1	HiFi HS	50
HEK_103	HEK	2.2	17		SSRT	SMARTer	1		KAPA	
HEK_104	HEK	66	50	智人	II	dT30VN	2	1	HiFi HS	50
HEK_105	HEK	1.5	18		SSRT	SMARTer	1		KAPA	
HEK_106	HEK	30	50	智人	II	dT30VN	2	1	HiFi HS	50
HEK_107	HEK	1.8	17		SSRT	SMARTer	1		KAPA	
HEK_108	HEK	83	03	智人	II	dT30VN	2	1	HiFi HS	50
HEK_109	HEK	4.1	19		SSRT	SMARTer	1		KAPA	
HEK_110	HEK	05	29	智人	II	dT30VN	2	1	HiFi HS	50
HEK_111	HEK	2.5	20		SSRT	SMARTer	1		KAPA	
HEK_112	HEK	80	09	智人	II	dT30VN	2	1	HiFi HS	50
HEK_113	HEK	2.5	19		SSRT	SMARTer	1		KAPA	
HEK_114	HEK	72	10	智人	II	dT30VN	2	1	HiFi HS	50
HEK_115	HEK	1.4	19		SSRT	SMARTer	1		KAPA	
HEK_116	HEK	96	73	智人	II	dT30VN	2	1	HiFi HS	50
HEK_117	HEK	3.4	19		SSRT	SMARTer	1		KAPA	
HEK_118	HEK	59	08	智人	II	dT30VN	2	1	HiFi HS	50
HEK_119	HEK	4.5	19		SSRT	SMARTer	1		Advanta	
HEK_120	HEK	91	21	智人	II	dT30VN	2	1	ge	50
HEK_121	HEK	3.8	19		SSRT	SMARTer	1		Advanta	
HEK_122	HEK	41	72	智人	II	dT30VN	2	1	ge	50
HEK_123	HEK	4.2	19		SSRT	SMARTer	1		Advanta	
HEK_124	HEK	79	16	智人	II	dT30VN	2	1	ge	50
HEK_125	HEK	2.1	16		SSRT	SMARTer	1		KAPA	
HEK_126	HEK	23	48	智人	II	dT30VN	2	1	HiFi HS	50
HEK_127	HEK	2.5	18		SSRT	SMARTer	1		KAPA	
HEK_128	HEK	26	45	智人	II	dT30VN	2	1	HiFi HS	50

[0265]

HEK_11	HEK	293T	智人	2.0	15				SSRT	SMARTer	1	1	-	KAPA	50
HEK_11	HEK	293T	智人	84	69	rGrG+N	2	2	II	dT30VN	2	1	-	HiFi HS	50
HEK_11	HEK	293T	智人	0.5	16				SSRT	SMARTer	1	1	-	KAPA	50
HEK_11	HEK	293T	智人	11	28	rGrG+N	2	2	II	dT30VN	2	1	-	HiFi HS	50
HEK_11	HEK	293T	智人	2.6	18				SSRT	SMARTer	1	1	-	Advanta	50
HEK_11	HEK	293T	智人	90	23	rGrG+N	2	2	II	dT30VN	2	1	-	ge	50
HEK_11	HEK	293T	智人	1.4	17				SSRT	SMARTer	1	1	-	Advanta	50
HEK_11	HEK	293T	智人	54	74	rGrG+N	2	2	II	dT30VN	2	1	-	ge	50
HEK_11	HEK	293T	智人	0.3	15				SSRT	SMARTer	1	1	-	Advanta	50
HEK_11	HEK	293T	智人	61	98	rGrG+N	2	2	II	dT30VN	2	1	-	ge	50
HEK_12	HEK	293T	智人	1.2	19				SSRT	SMARTer	1	1	-	KAPA	50
HEK_12	HEK	293T	智人	15	35	rGrG+N	2	2	II	dT30VN	2	1	-	HiFi HS	50
HEK_12	HEK	293T	智人	0.4	16				SSRT	SMARTer	1	1	-	KAPA	50
HEK_12	HEK	293T	智人	34	82	rGrG+N	2	2	II	dT30VN	2	1	-	HiFi HS	50
HEK_12	HEK	293T	智人	0.7	15				SSRT	SMARTer	1	1	-	KAPA	50
HEK_12	HEK	293T	智人	39	53	rGrG+N	2	2	II	dT30VN	2	1	-	HiFi HS	50
HEK_12	HEK	293T	智人	1.5	16				SSRT	SMARTer	1	1	-	KAPA	50
HEK_12	HEK	293T	智人	99	88	rGrG+N	2	2	II	dT30VN	2	1	-	HiFi HS	50
HEK_12	HEK	293T	智人	2.3	16				SSRT	SMARTer	1	1	-	KAPA	50
HEK_12	HEK	293T	智人	01	17	rGrG+N	2	2	II	dT30VN	2	1	-	HiFi HS	50
HEK_13	HEK	293T	智人	0.7	18				SSRT	SMARTer	1	1	-	KAPA	50
HEK_13	HEK	293T	智人	84	10	rGrG+G	1	1	II	dT30VN	2	1	-	HiFi HS	2x dCTP
HEK_13	HEK	293T	智人	1.3	19				SSRT	SMARTer	1	1	-	KAPA	50
HEK_13	HEK	293T	智人	11	90	rGrG+G	1	1	II	dT30VN	2	1	-	HiFi HS	2x dCTP
HEK_13	HEK	293T	智人	0.8	18				SSRT	SMARTer	1	1	-	KAPA	50
HEK_13	HEK	293T	智人	95	29	rGrG+G	1	1	II	dT30VN	2	1	-	HiFi HS	2x dCTP
HEK_13	HEK	293T	智人	1.3	19				SSRT	SMARTer	1	1	-	KAPA	50
HEK_13	HEK	293T	智人	18	48	rGrG+G	1	1	II	dT30VN	2	1	-	HiFi HS	2x dCTP
HEK_13	HEK	293T	智人	1.8	17				SSRT	SMARTer	1	1	-	KAPA	50
HEK_13	HEK	293T	智人	53	04	rGrG+G	1	1	II	dT30VN	2	1	-	HiFi HS	2x dCTP
HEK_14	HEK	293T	智人	4.0	18	rGrG+G	1	1	SSRT	SMARTer	1	1	-	KAPA	50
HEK_14	HEK	293T	智人	4.0	18	rGrG+G	1	1	SSRT	SMARTer	1	1	-	KAPA	2x dCTP(非单细胞)

[0266]

0	HEK_14	HEK_293T	09	33		II	dt30VN	2	1	HFHS	50	可能是细胞聚集体
HEK_14	HEK_293T	HEK_293T	5.2	18		SSRT	SMARTer	1	1	KAPA	50	可能是细胞聚集体
HEK_14	HEK_293T	HEK_293T	4.8	17	1	II	dt30VN	2	1	Advanta	50	可能是细胞聚集体
HEK_14	HEK_293T	HEK_293T	03	66	2	II	SMARTer	1	1	Advanta	50	可能是细胞聚集体
HEK_14	HEK_293T	HEK_293T	2.1	16	2	II	dt30VN	2	1	Advanta	50	可能是细胞聚集体
HEK_14	HEK_293T	HEK_293T	66	19	2	II	SMARTer	1	1	Advanta	50	可能是细胞聚集体
HEK_14	HEK_293T	HEK_293T	2.2	15	2	II	dt30VN	2	1	Advanta	50	可能是细胞聚集体
HEK_14	HEK_293T	HEK_293T	83	52	2	II	SMARTer	1	1	Advanta	50	可能是细胞聚集体
HEK_14	HEK_293T	HEK_293T	2.0	13	2	II	dt30VN	2	1	Advanta	50	可能是细胞聚集体
HEK_14	HEK_293T	HEK_293T	99	16	2	II	SMARTer	1	1	Advanta	50	可能是细胞聚集体
HEK_14	HEK_293T	HEK_293T	2.1	13	2	II	dt30VN	2	1	Advanta	50	可能是细胞聚集体
HEK_14	HEK_293T	HEK_293T	91	39	2	II	SMARTer	1	1	Advanta	50	可能是细胞聚集体
HEK_14	HEK_293T	HEK_293T	1.5	14	2	II	dt30VN	2	1	Advanta	50	可能是细胞聚集体
HEK_14	HEK_293T	HEK_293T	60	26	2	II	SMARTer	1	1	Advanta	50	可能是细胞聚集体
HEK_15	HEK_293T	HEK_293T	2.8	15	2	II	dt30VN	2	1	Advanta	50	可能是细胞聚集体
HEK_15	HEK_293T	HEK_293T	30	08	2	II	SMARTer	1	1	Advanta	50	可能是细胞聚集体
HEK_15	HEK_293T	HEK_293T	2.2	12	2	II	dt30VN	2	1	Advanta	50	可能是细胞聚集体
HEK_15	HEK_293T	HEK_293T	20	20	2	II	SMARTer	1	1	Advanta	50	可能是细胞聚集体
HEK_15	HEK_293T	HEK_293T	2.6	15	2	II	dt30VN	2	1	Advanta	50	可能是细胞聚集体
HEK_15	HEK_293T	HEK_293T	54	34	2	II	SMARTer	1	1	Advanta	50	可能是细胞聚集体
HEK_15	HEK_293T	HEK_293T	2.0	16	2	II	dt30VN	2	1	Advanta	50	可能是细胞聚集体
HEK_15	HEK_293T	HEK_293T	39	55	2	II	SMARTer	1	1	Advanta	50	可能是细胞聚集体
HEK_15	HEK_293T	HEK_293T	3.0	18	2	II	dt30VN	2	1	Advanta	50	可能是细胞聚集体
HEK_15	HEK_293T	HEK_293T	01	37	2	II	SMARTer	1	1	Advanta	50	可能是细胞聚集体
HEK_15	HEK_293T	HEK_293T	1.3	18	2	II	dt30VN	2	1	Advanta	50	可能是细胞聚集体
HEK_15	HEK_293T	HEK_293T	78	46	2	II	SMARTer	1	1	Advanta	50	可能是细胞聚集体
HEK_15	HEK_293T	HEK_293T	1.0	18	2	II	dt30VN	2	1	Advanta	50	可能是细胞聚集体
HEK_15	HEK_293T	HEK_293T	65	53	2	II	SMARTer	1	1	Advanta	50	可能是细胞聚集体
HEK_15	HEK_293T	HEK_293T	1.6	17	2	II	dt30VN	2	1	Advanta	50	可能是细胞聚集体

[0267]

7	293T	21	72		II	dt30	2		ge	
HEK_15	HEK	2.4	17		SSRT	SMARTer	1		Advanta	
8	293T	18	06	智人	II	dt30	2	1	ge	50
HEK_S	HEK	0.1	14		SMA	SMARTer			Advanta	
MRT_5	293T	28	95	智人	RTsc ribe	dt30VN	6	1	ge	50
HEK_S	HEK	0.0	14		SMA	SMARTer			Advanta	
MRT_6	293T	42	69	智人	RTsc ribe	dt30VN	6	1	ge	50
HEK_S	HEK	0.2	13		SMA	SMARTer			Advanta	
MRT_7	293T	07	59	智人	RTsc ribe	dt30VN	6	1	ge	50
HEK_S	HEK	0.2	13		SMA	SMARTer			Advanta	
MRT_8	293T	46	40	智人	RTsc ribe	dt30VN	6	1	ge	50
HEK_S	HEK	0.1	14		SMA	SMARTer			Advanta	
MRT_9	293T	52	55	智人	RTsc ribe	dt30VN	6	1	ge	50
HEK_S	HEK	0.2	12		SMA	SMARTer			Advanta	
MRT_10	293T	56	28	智人	RTsc ribe	dt30VN	6	1	ge	50
HEK_S	HEK	0.0	12		SMA	SMARTer			Advanta	
MRT_11	293T	72	38	智人	RTsc ribe	dt30VN	6	1	ge	50
HEK_S	HEK	0.2	12		SMA	SMARTer			Advanta	
MRT_12	293T	56	92	智人	RTsc ribe	dt30VN	6	1	ge	50
C_1	C2C	3.0	16	小家鼠 (<i>Mus musculus</i>)	SSRT	SMARTer	1		KAPA	25
C_2	C2C	03	96		II	dt30VN	2	1	HIFI HS	25
		1.1	17	小家鼠	SSRT	SMARTer	1	1	KAPA	25

可能是细胞聚集体

[0268]

	12	(<i>M.muscul</i> <i>us</i>)	10	72		II	dT30VN	2		HiFi HS		
C 3	C2C 12	小家鼠 (<i>M.muscul</i> <i>us</i>)	1.1 57	16 60	rGrG+G	1	SSRT II	SMARTer dT30VN	1 2	- -	KAPA HiFi HS	25
C 4	C2C 12	小家鼠 (<i>M.muscul</i> <i>us</i>)	1.9 65	16 74	rGrG+G	1	SSRT II	SMARTer dT30VN	1 2	- -	KAPA HiFi HS	25
C 5	C2C 12	小家鼠 (<i>M.muscul</i> <i>us</i>)	2.8 84	17 08	rGrG+G	1	SSRT II	SMARTer dT30VN	1 2	- -	KAPA HiFi HS	25
C 6	C2C 12	小家鼠 (<i>M.muscul</i> <i>us</i>)	2.3 25	16 46	rGrG+G	1	SSRT II	SMARTer dT30VN	1 2	- -	KAPA HiFi HS	25
C 7	C2C 12	小家鼠 (<i>M.muscul</i> <i>us</i>)	1.9 41	15 77	rGrG+G	1	SSRT II	SMARTer dT30VN	1 2	- -	KAPA HiFi HS	25
C 8	C2C 12	小家鼠 (<i>M.muscul</i> <i>us</i>)	2.2 48	16 66	rGrG+G	1	SSRT II	SMARTer dT30VN	1 2	- -	KAPA HiFi HS	25
C 9	C2C 12	小家鼠 (<i>M.muscul</i> <i>us</i>)	1.3 79	16 14	rGrG+G	1	SSRT II	SMARTer dT30VN	1 2	- -	KAPA HiFi HS	50
C 10	C2C 12	小家鼠 (<i>M.muscul</i> <i>us</i>)	1.8 32	18 09	rGrG+G	1	SSRT II	SMARTer dT30VN	1 2	- -	KAPA HiFi HS	50
C 11	C2C 12	小家鼠 (<i>M.muscul</i> <i>us</i>)	3.6 44	17 35	rGrG+G	1	SSRT II	SMARTer dT30VN	1 2	- -	KAPA HiFi HS	50
C 12	C2C	小家鼠	1.2	17	rGrG+G	1	SSRT	SMARTer	1	-	KAPA	50

[0269]

12	(<i>M.muscul</i> <i>us</i>)	45	35			II	dT30VN	2			HiFi HS	
C 13	小家鼠 (<i>M.muscul</i> <i>us</i>)	1.9 13	18 96	rGrG+G	1	SSRT II	SMARTer dT30VN	1 2	1	-	KAPA HiFi HS	50
C 14	小家鼠 (<i>M.muscul</i> <i>us</i>)	1.7 93	18 36	rGrG+G	1	SSRT II	SMARTer dT30VN	1 2	1	-	KAPA HiFi HS	50
C 15	小家鼠 (<i>M.muscul</i> <i>us</i>)	1.5 88	19 37	rGrG+G	1	SSRT II	SMARTer dT30VN	1 2	1	-	KAPA HiFi HS	50
C 16	小家鼠 (<i>M.muscul</i> <i>us</i>)	1.7 30	19 37	rGrG+G	1	SSRT II	SMARTer dT30VN	1 2	1	-	KAPA HiFi HS	50
MEF 1	小家鼠 (<i>M.muscul</i> <i>us</i>)	0.9 99	13 97	rGrG+G	1	SSRT II	SMARTer dT30VN	1 2	1	-	KAPA HiFi HS	25
MEF 2	小家鼠 (<i>M.muscul</i> <i>us</i>)	2.8 62	17 10	rGrG+G	1	SSRT II	SMARTer dT30VN	1 2	1	-	KAPA HiFi HS	25
MEF 3	小家鼠 (<i>M.muscul</i> <i>us</i>)	1.5 71	15 77	rGrG+G	1	SSRT II	SMARTer dT30VN	1 2	1	-	KAPA HiFi HS	25
MEF 4	小家鼠 (<i>M.muscul</i> <i>us</i>)	1.1 20	14 89	rGrG+G	1	SSRT II	SMARTer dT30VN	1 2	1	-	KAPA HiFi HS	25
MEF 5	小家鼠 (<i>M.muscul</i> <i>us</i>)	2.1 21	16 72	rGrG+G	1	SSRT II	SMARTer dT30VN	1 2	1	-	KAPA HiFi HS	25
MEF 6	小家鼠	5.0	16	rGrG+G	1	SSRT	SMARTer	1	1	-	KAPA	25

可能是细胞聚集体

[0271]

		(M.muscul us)	45				II	dT30VN	2		HiFi HS	
MEF 17	MEF	小家鼠 (M.muscul us)	0.4 97	18 03	rGrGrG	1	SSRT II	SMARTer dT30VN	1 2	1 -	KAPA HiFi HS	50
MEF 18	MEF	小家鼠 (M.muscul us)	0.4 27	18 79	rGrGrG	1	SSRT II	SMARTer dT30VN	1 2	1 -	KAPA HiFi HS	50
MEF 19	MEF	小家鼠 (M.muscul us)	0.4 06	18 73	rGrGrG	1	SSRT II	SMARTer dT30VN	1 2	1 -	KAPA HiFi HS	50
MEF 20	MEF	小家鼠 (M.muscul us)	0.6 80	19 84	rGrGrG	1	SSRT II	SMARTer dT30VN	1 2	1 -	KAPA HiFi HS	50
MEF 21	MEF	小家鼠 (M.muscul us)	0.4 29	17 38	rGrGrG	1	SSRT II	SMARTer dT30VN	1 2	1 -	KAPA HiFi HS	50
MEF 22	MEF	小家鼠 (M.muscul us)	0.6 34	20 89	rGrGrG	1	SSRT II	SMARTer dT30VN	1 2	1 -	KAPA HiFi HS	50
MEF 23	MEF	小家鼠 (M.muscul us)	0.7 22	20 19	rGrGrG	1	SSRT II	SMARTer dT30VN	1 2	1 -	KAPA HiFi HS	50
MEF 24	MEF	小家鼠 (M.muscul us)	0.3 97	18 81	rGrGrG	1	SSRT II	SMARTer dT30VN	1 2	1 -	KAPA HiFi HS	50
MEF 25	MEF	小家鼠 (M.muscul us)	0.9 81	20 07	rGrG+G	1	SSRT II	SMARTer dT30VN	1 2	1 -	Advanta ge	50
MEF 26	MEF	小家鼠	0.6	18	rGrG+G	1	SSRT	SMARTer	1	1	Advanta	50

[0272]

		(<i>M.muscul</i> <i>us</i>)	26	27				II	dT30VN	2		ge	
MEF 28	MEF	小家鼠 (<i>M.muscul</i> <i>us</i>)	0.6 56	19 79				SSRT II	SMARTer dT30VN	1 2	1 -	Advanta ge	50
MEF 29	MEF	小家鼠 (<i>M.muscul</i> <i>us</i>)	1.3 56	21 43				SSRT II	SMARTer dT30VN	1 2	1 -	Advanta ge	50
MEF 30	MEF	小家鼠 (<i>M.muscul</i> <i>us</i>)	1.2 42	21 37				SSRT II	SMARTer dT30VN	1 2	1 -	Advanta ge	50
MEF 31	MEF	小家鼠 (<i>M.muscul</i> <i>us</i>)	2.2 40	20 15				SSRT II	SMARTer dT30VN	1 2	1 -	Advanta ge	50
MEF 32	MEF	小家鼠 (<i>M.muscul</i> <i>us</i>)	0.7 81	18 17				SSRT II	SMARTer dT30VN	1 2	1 -	Advanta ge	50
MEF 33	MEF	小家鼠 (<i>M.muscul</i> <i>us</i>)	0.6 03	17 81				SSRT II	SMARTer dT30VN	1 2	1 -	KAPA HiFi HS	50
MEF 34	MEF	小家鼠 (<i>M.muscul</i> <i>us</i>)	5.0 14	18 94				SSRT II	SMARTer dT30VN	1 2	1 -	KAPA HiFi HS	50 可能是细胞聚集体
MEF 35	MEF	小家鼠 (<i>M.muscul</i> <i>us</i>)	1.6 51	20 64				SSRT II	SMARTer dT30VN	1 2	1 -	KAPA HiFi HS	50
MEF 36	MEF	小家鼠 (<i>M.muscul</i> <i>us</i>)	1.0 17	17 73				SSRT II	SMARTer dT30VN	1 2	1 -	KAPA HiFi HS	50
MEF 37	MEF	小家鼠	1.1	17				SSRT	SMARTer	1	1	KAPA	50

[0274]

SMRT_7	C2C 12	小鼠 (<i>M.musculus</i>)	0.1 61	15 25	SMARTer Oligo IIA	1	SMA RTsc ribe	SMARTer dT30VN	1 2	是	Advanta ge	50
SMRT_8	C2C 12	小鼠 (<i>M.musculus</i>)	0.1 78	13 14	SMARTer Oligo IIA	1	SMA RTsc ribe	SMARTer dT30VN	1 2	是	Advanta ge	50
SMRT_9	C2C 12	小鼠 (<i>M.musculus</i>)	0.0 36	13 63	SMARTer Oligo IIA	1	SMA RTsc ribe	SMARTer dT30VN	1 2	是	Advanta ge	50
SMRT_10	C2C 12	小鼠 (<i>M.musculus</i>)	0.1 29	12 61	SMARTer Oligo IIA	1	SMA RTsc ribe	SMARTer dT30VN	1 2	是	Advanta ge	50
SMRT_11	C2C 12	小鼠 (<i>M.musculus</i>)	0.0 80	12 34	SMARTer Oligo IIA	1	SMA RTsc ribe	SMARTer dT30VN	1 2	是	Advanta ge	50
SMRT_12	C2C 12	小鼠 (<i>M.musculus</i>)	0.1 11	14 47	SMARTer Oligo IIA	1	SMA RTsc ribe	SMARTer dT30VN	1 2	是	Advanta ge	50
SMRT_14	C2C 12	小鼠 (<i>M.musculus</i>)	0.0 81	14 08	SMARTer Oligo IIA	1	SMA RTsc ribe	SMARTer dT30VN	1 2	是	Advanta ge	50
SMRT_16	C2C 12	小鼠 (<i>M.musculus</i>)	0.0 74	12 80	SMARTer Oligo IIA	1	SMA RTsc ribe	SMARTer dT30VN	1 2	是	Advanta ge	50
BC_1	B细胞	智人	0.8 26	16 57	rGrG+G	1	SSRT II	SMARTer dT30VN	1 2	-	KAPA HiFi HS	50
BC_3	B细胞	智人	1.0 91	16 59	rGrG+G	1	SSRT II	SMARTer dT30VN	1 2	-	KAPA HiFi HS	50
BC_4	B细胞	智人	0.4 16	16	rGrG+G	1	SSRT	SMARTer	1 1	-	KAPA	50

[0275]

	胞		01	49			II	dt30VN	2		HiFi HS	
BC_5	B细胞	智人	0.5 01	15 47	rGrG+G	1	SSRT II	SMARTer dt30VN	1 2	1	KAPA HiFi HS	50
BC_6	B细胞	智人	0.5 73	15 34	rGrG+G	1	SSRT II	SMARTer dt30VN	1 2	1	KAPA HiFi HS	50
BC_7	B细胞	智人	0.3 28	13 43	rGrG+G	1	SSRT II	SMARTer dt30VN	1 2	1	KAPA HiFi HS	50
BC_8	B细胞	智人	0.6 61	16 07	rGrG+G	1	SSRT II	SMARTer dt30VN	1 2	1	KAPA HiFi HS	50
BC_9	B细胞	智人	0.5 00	16 05	rGrG+G	1	SSRT II	SMARTer dt30VN	1 2	1	KAPA HiFi HS	50
BC_10	B细胞	智人	0.8 40	17 82	rGrG+G	1	SSRT II	SMARTer dt30VN	1 2	1	KAPA HiFi HS	50
BC_11	B细胞	智人	0.8 29	18 13	rGrG+G	1	SSRT II	SMARTer dt30VN	1 2	1	KAPA HiFi HS	50
BC_12	B细胞	智人	0.6 48	16 42	rGrG+G	1	SSRT II	SMARTer dt30VN	1 2	1	KAPA HiFi HS	50
BC_13	B细胞	智人	0.2 97	18 15	rGrG+G	1	SSRT II	SMARTer dt30VN	1 2	1	KAPA HiFi HS	50
BC_15	B细胞	智人	0.9 82	18 25	rGrG+G	1	SSRT II	SMARTer dt30VN	1 2	1	KAPA HiFi HS	50
HEK_15_9	HEK 293T	智人	3.0 57	14 64	rGrG+G	1	SSRT II	SMARTer dt30VN	1 5	1	KAPA HiFi HS	25
HEK_16_0	HEK 293T	智人	3.5 06	17 99	rGrG+G	1	SSRT II	SMARTer dt30VN	1 5	1	KAPA HiFi HS	25
HEK_16_1	HEK 293T	智人	2.0 27	16 11	rGrG+G	1	SSRT II	SMARTer dt30VN	1 5	1	KAPA HiFi HS	25
HEK_16	HEK	智人	2.5	17	rGrG+G	1	SSRT	SMARTer	1	1	KAPA	25

可能是细胞聚集体

可能是细胞聚集体

[0276]

2	293T	13	14			II	dT30VN	5		HiFi HS	
HEK_16	HEK	0.5	90			SSRT	SMARTer	2		KAPA	
HEK_3	293T	58	9		rGrG+G	II	dT30VN	0	1	HiFi HS	25
HEK_16	HEK	1.4	13			SSRT	SMARTer	2		KAPA	
HEK_4	293T	90	97		rGrG+G	II	dT30VN	0	1	HiFi HS	25
HEK_16	HEK	0.6	13			SSRT	SMARTer	2		KAPA	
HEK_5	293T	06	34		rGrG+G	II	dT30VN	0	1	HiFi HS	25
HEK_16	HEK	1.2	15			SSRT	SMARTer	2		KAPA	
HEK_6	293T	03	15		rGrG+G	II	dT30VN	0	1	HiFi HS	25
BC_17	B细胞	0.3	16			SSRT	SMARTer	1		KAPA	
BC_17	细胞	93	03		rGrG+G	II	dT30VN	2	-	HiFi HS	50
BC_19	B细胞	0.2	17			SSRT	SMARTer	1		KAPA	
BC_19	细胞	16	30		rGrG+G	II	dT30VN	2	-	HiFi HS	50
BC_20	B细胞	0.0	11			SSRT	SMARTer	1		KAPA	
BC_20	细胞	74	31		rGrG+G	II	dT30VN	2	-	HiFi HS	50
BC_21	B细胞	0.1	14			SSRT	SMARTer	1		KAPA	
BC_21	细胞	26	45		rGrG+G	II	dT30VN	2	-	HiFi HS	50
BC_22	B细胞	0.3	17			SSRT	SMARTer	1		KAPA	
BC_22	细胞	25	02		rGrG+G	II	dT30VN	2	-	HiFi HS	50
BC_23	B细胞	0.1	17			SSRT	SMARTer	1		KAPA	
BC_23	细胞	83	56		rGrG+G	II	dT30VN	2	-	HiFi HS	50
BC_24	B细胞	0.0	13			SSRT	SMARTer	1		KAPA	
BC_24	细胞	97	38		rGrG+G	II	dT30VN	2	-	HiFi HS	50
BC_25	B细胞	0.8	16			SSRT	SMARTer	1		KAPA	
BC_25	细胞	26	57		rGrG+G	II	dT30VN	2	1	HiFi HS	50
BC_26	B细胞	1.0	16			SSRT	SMARTer	1		KAPA	
BC_26	细胞	91	59		rGrG+G	II	dT30VN	2	1	HiFi HS	50
BC_27	B细胞	0.4	16			SSRT	SMARTer	1		KAPA	
BC_27	细胞				rGrG+G	II	dT30VN	1	1	HiFi HS	50

[0277]

	细胞		01	49				II	dT30VN	2		HiFi HS	
BC 28	B细胞	智人	0.5 01	15 47	rGrG+G	1		SSRT II	SMARTer dT30VN	1 2	1	KAPA HiFi HS	50
BC 29	B细胞	智人	0.5 73	15 34	rGrG+G	1		SSRT II	SMARTer dT30VN	1 2	1	KAPA HiFi HS	50
BC 30	B细胞	智人	0.3 28	13 43	rGrG+G	1		SSRT II	SMARTer dT30VN	1 2	1	KAPA HiFi HS	50
BC 31	B细胞	智人	0.6 61	16 07	rGrG+G	1		SSRT II	SMARTer dT30VN	1 2	1	KAPA HiFi HS	50
BC 32	B细胞	智人	0.5 00	16 05	rGrG+G	1		SSRT II	SMARTer dT30VN	1 2	1	KAPA HiFi HS	50
BC 33	B细胞	智人	0.8 40	17 82	rGrG+G	1		SSRT II	SMARTer dT30VN	1 2	1	KAPA HiFi HS	50
BC 34	B细胞	智人	0.8 29	18 13	rGrG+G	1		SSRT II	SMARTer dT30VN	1 2	1	KAPA HiFi HS	50
BC 35	B细胞	智人	0.6 48	16 42	rGrG+G	1		SSRT II	SMARTer dT30VN	1 2	1	KAPA HiFi HS	50
BC 36	B细胞	智人	0.2 97	18 15	rGrG+G	1		SSRT II	SMARTer dT30VN	1 2	1	KAPA HiFi HS	50
BC 37	B细胞	智人	0.9 82	18 25	rGrG+G	1		SSRT II	SMARTer dT30VN	1 2	1	KAPA HiFi HS	50
BC 38	B细胞	智人	0.8 53	17 95	rGrG+G	1		SSRT II	SMARTer dT30VN	1 2	1	KAPA HiFi HS	50

[0278]

表S4.Smart-seq2方案的详细变体

方案名称	TSO	TSO量 (ul)	在预扩增之前 珠粒纯化?	DNA聚合酶
Smart-seq 2	rGrG+G	1 ul (10 uM)	否	KAPA HiFi HotStart ReadyMix
变体1	rGrG+G	2 ul (10 uM)	否	KAPA HiFi HotStart ReadyMix
变体2	rGrG+N	2 ul (10 uM)	否	KAPA HiFi HotStart ReadyMix
变体3	rGrG+G	1 ul (10 uM)	否	Advantage2 KAPA HiFi HotStart ReadyMix
变体4	rGrG+G	1 ul (10 uM)	否	
SMARTer	SMARTer Oligo II A	1 ul (12 uM)	是	Advantage2

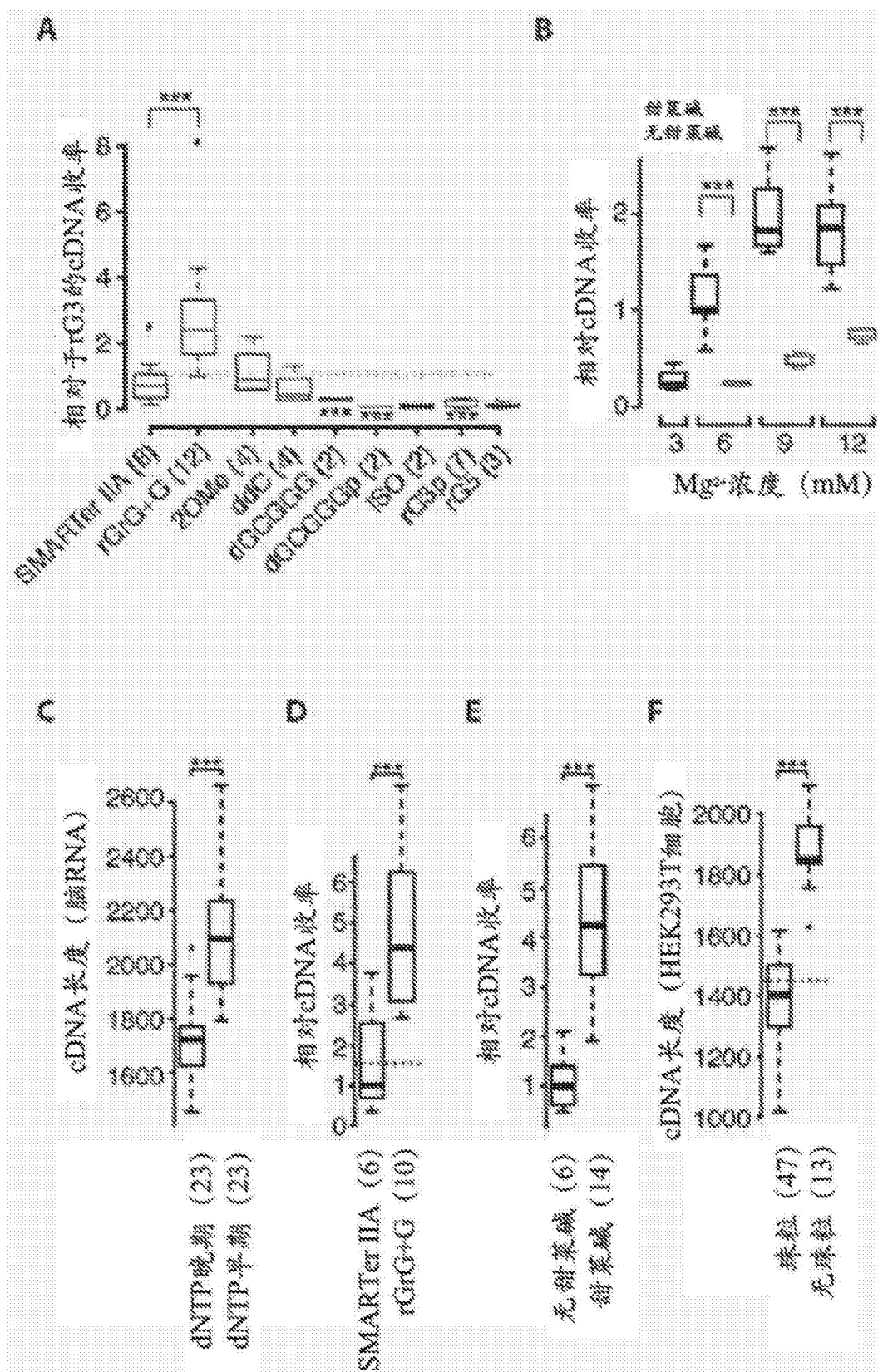


图1

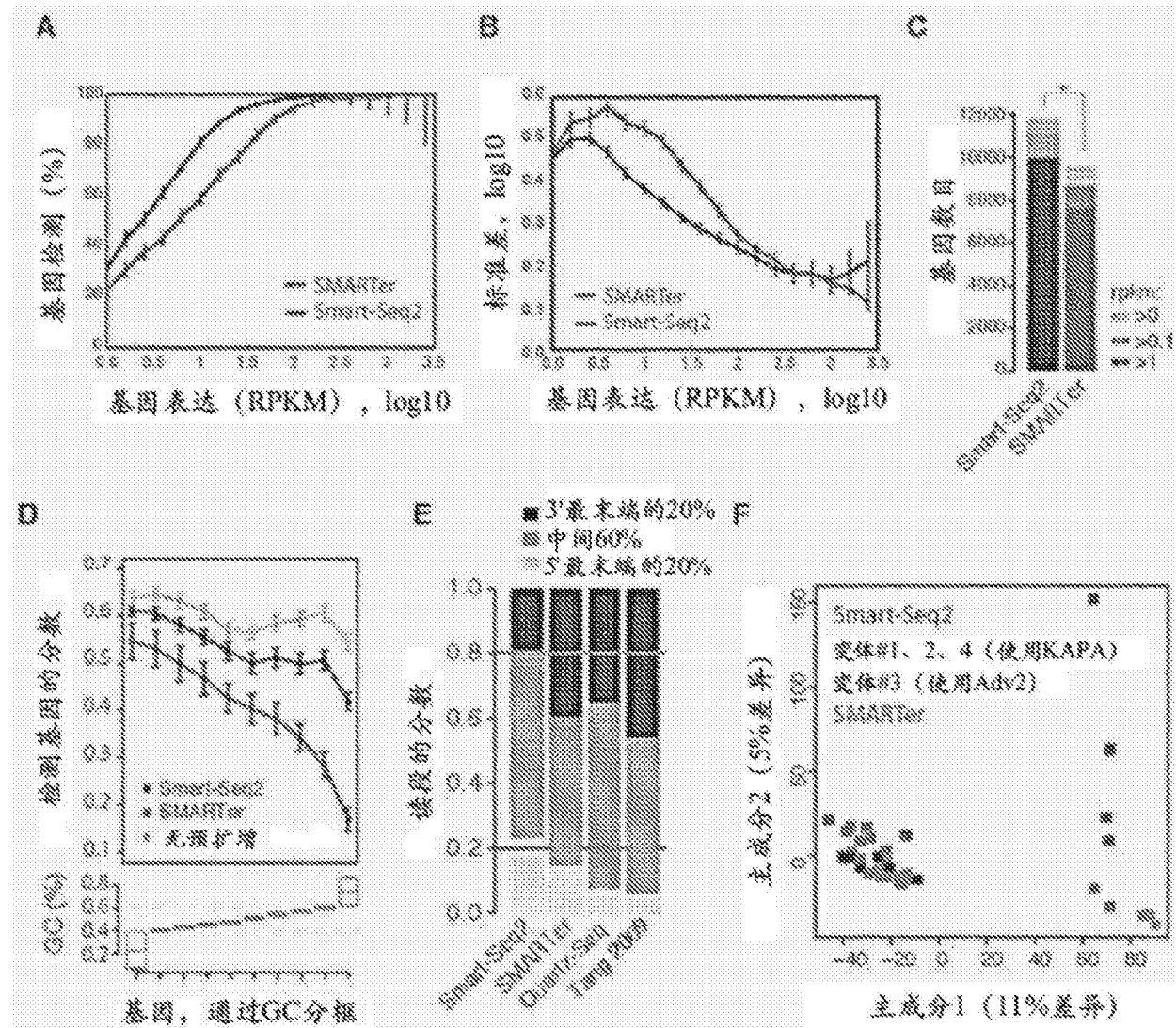


图2

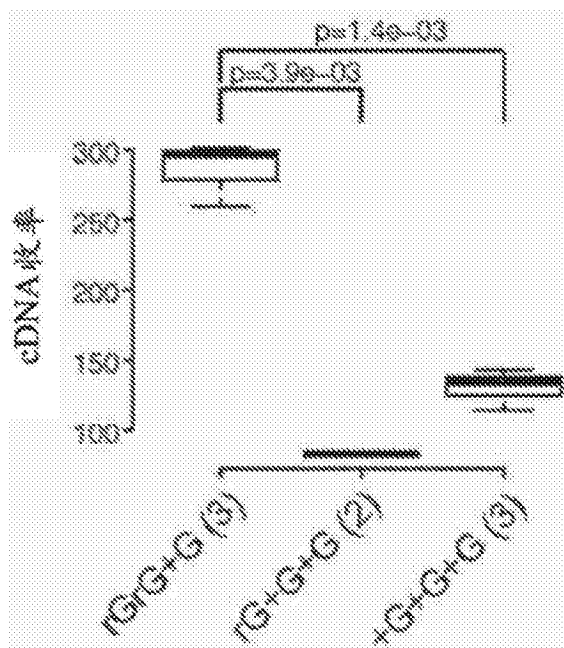


图3

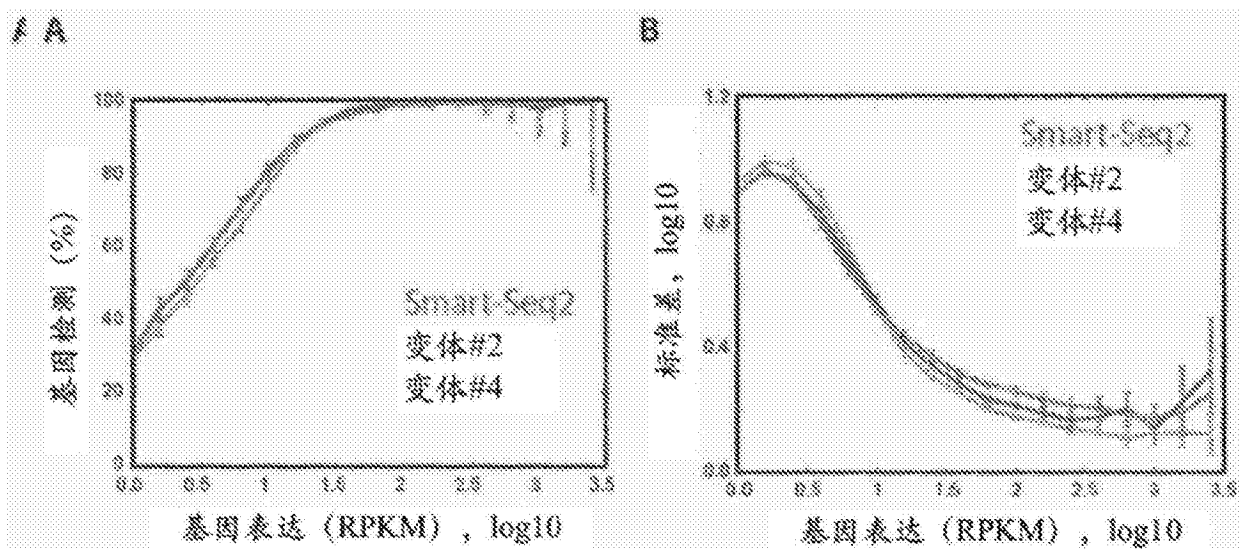


图4

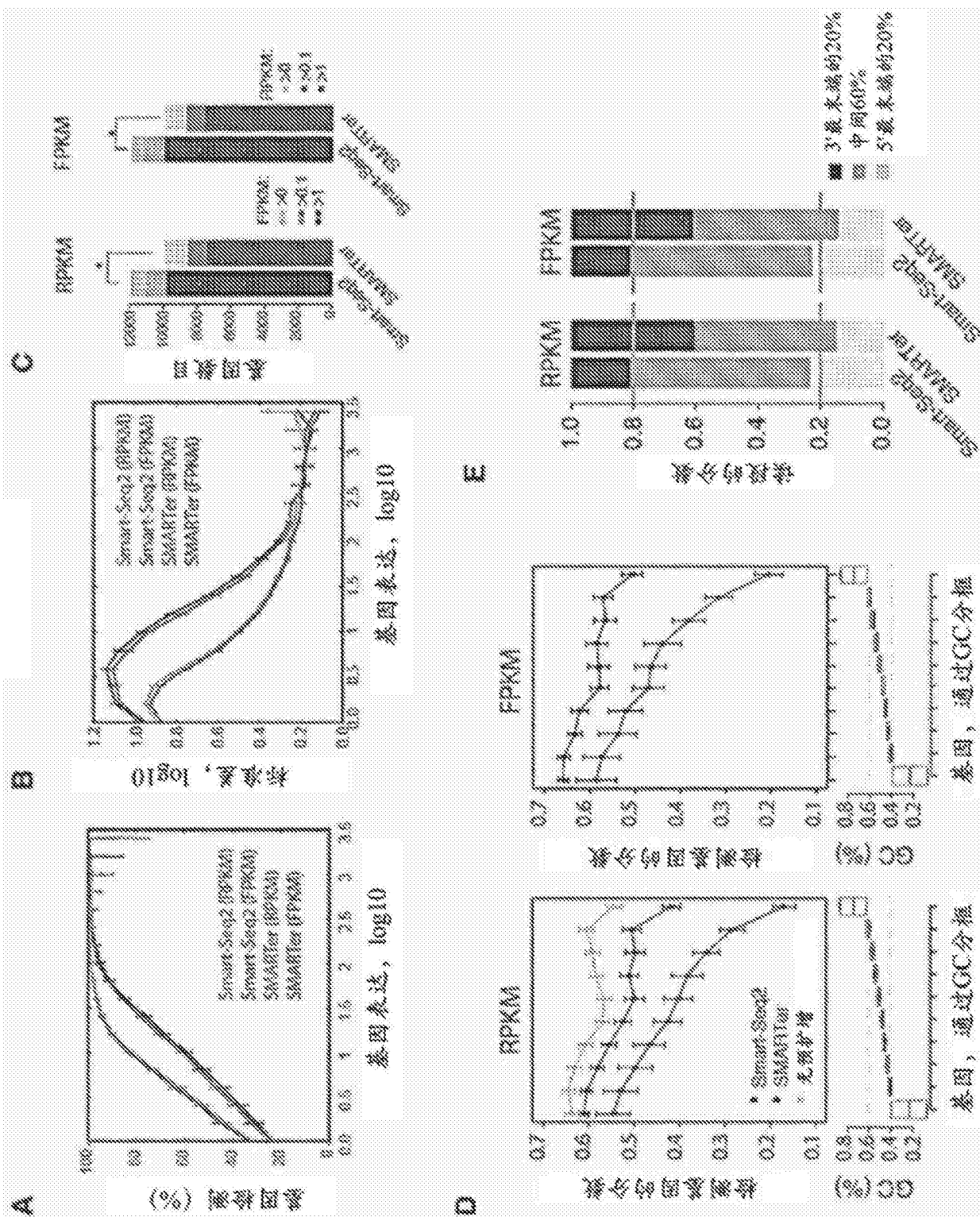


图5

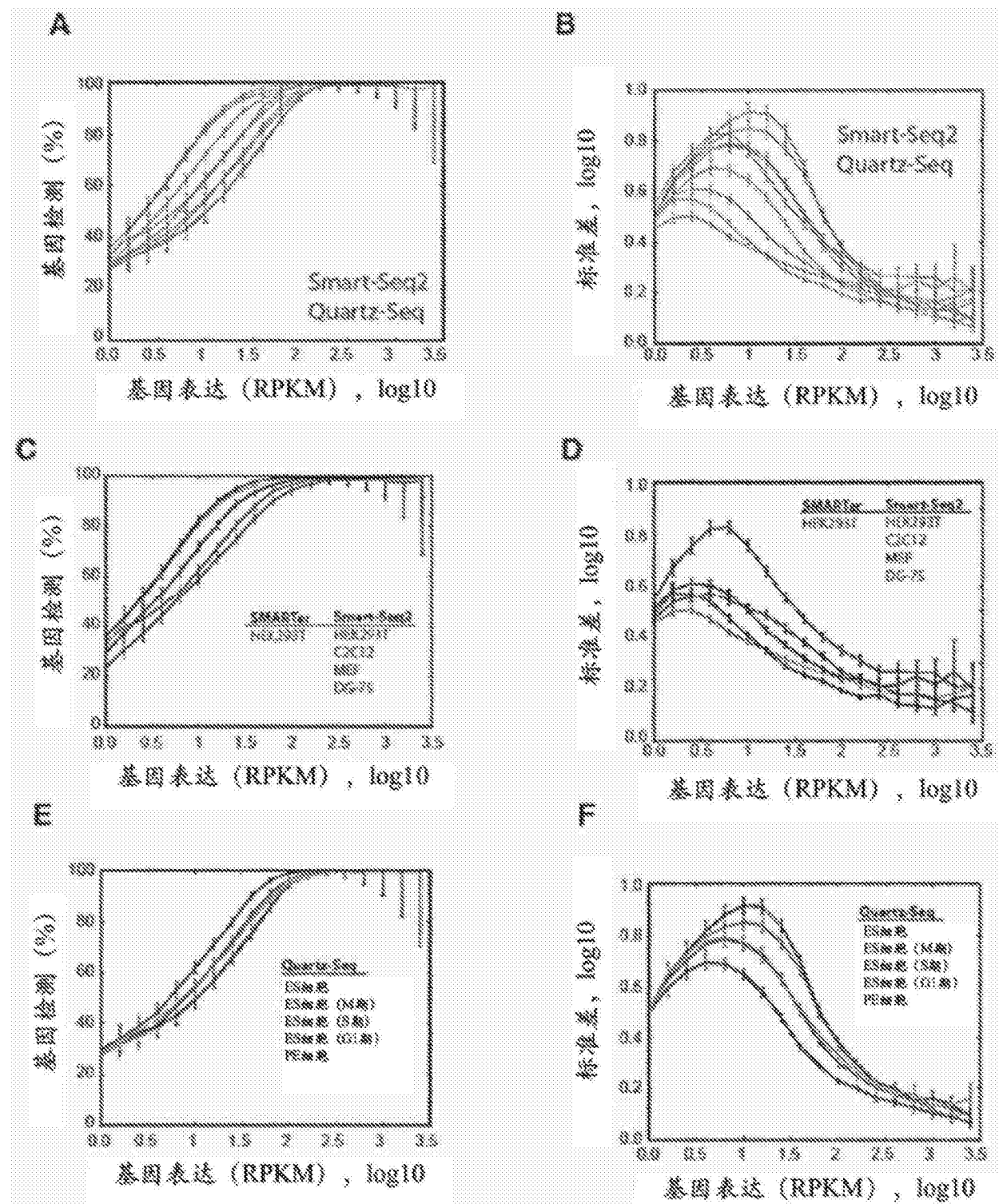


图6

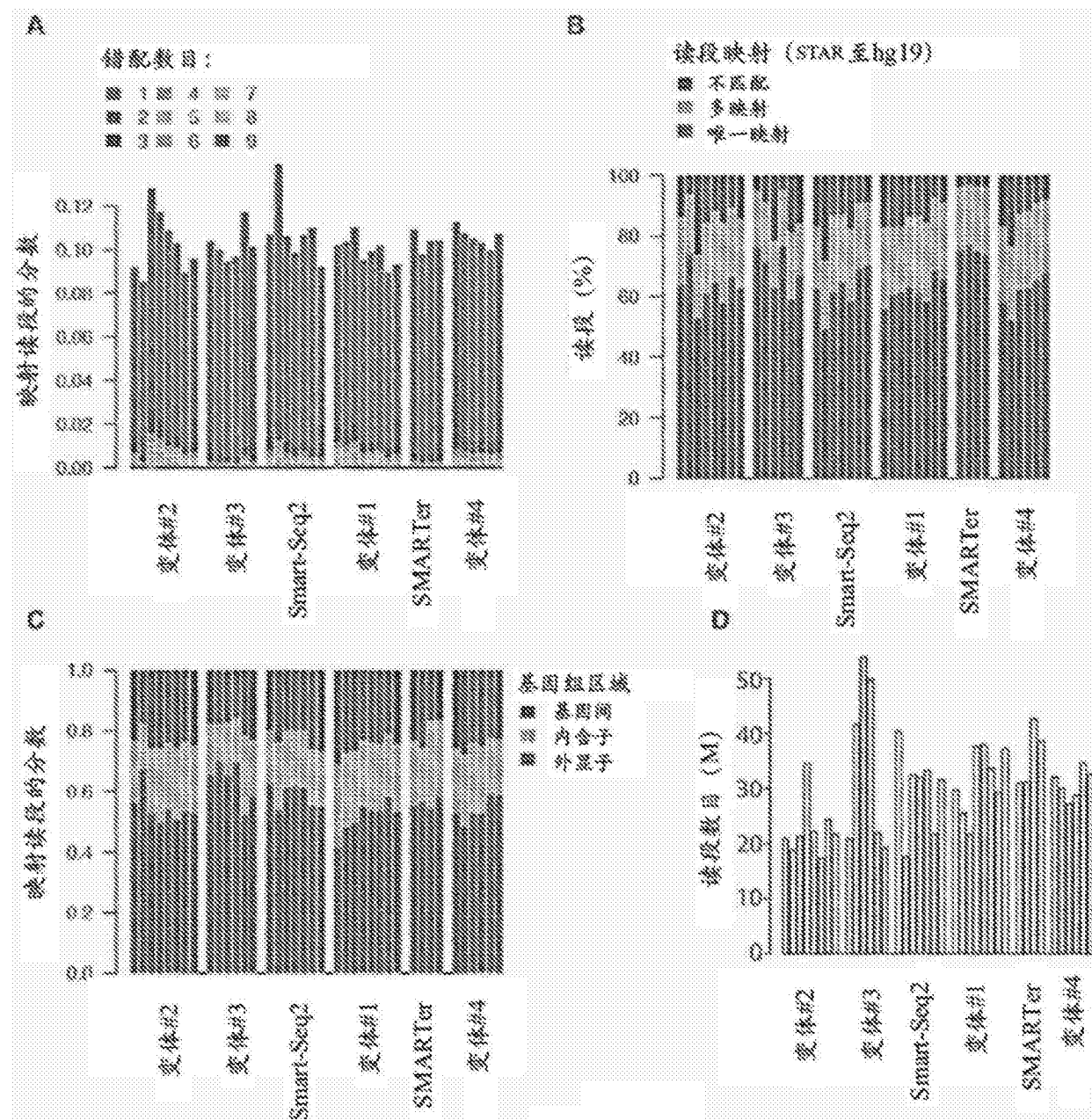


图7

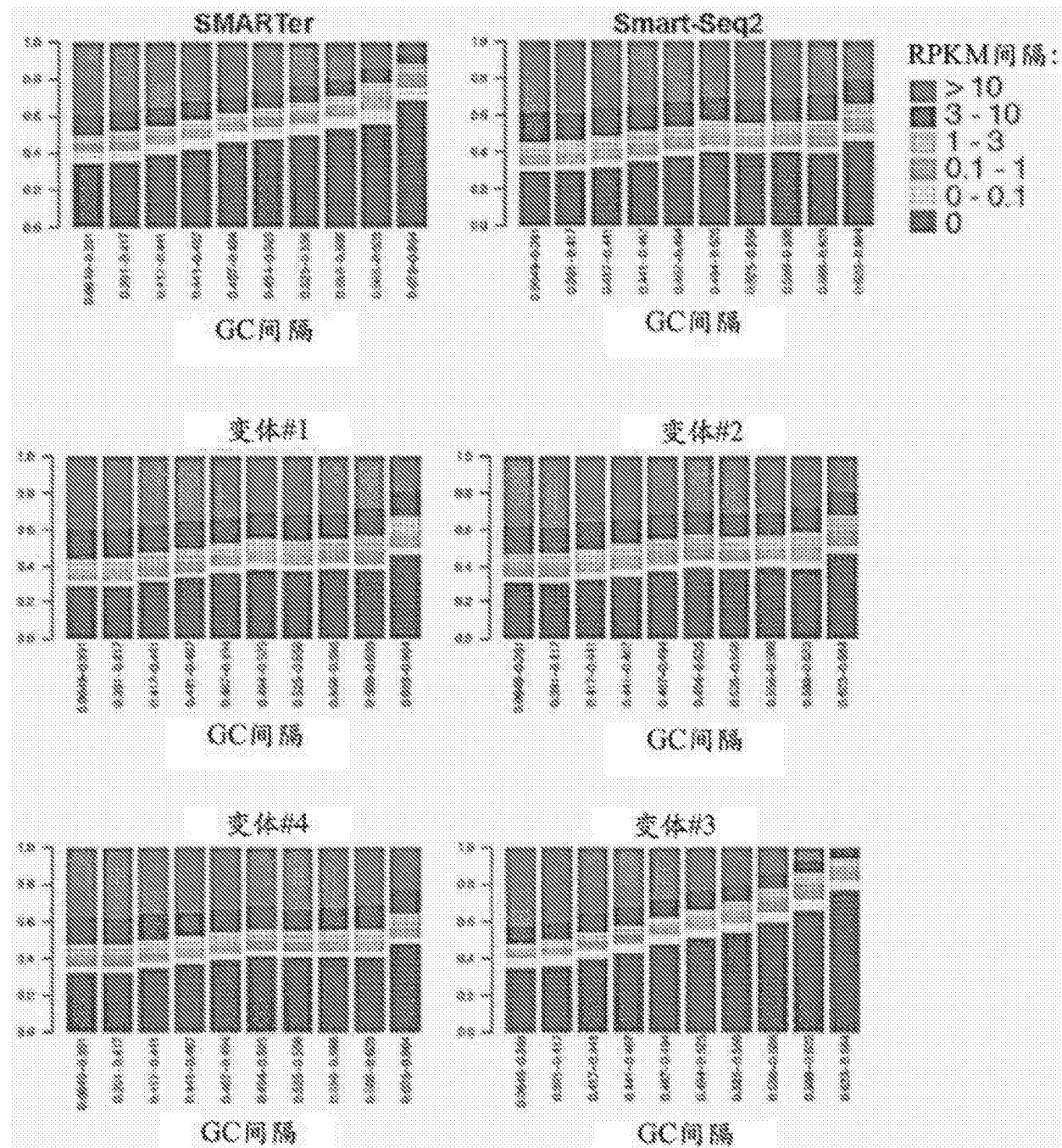


图8

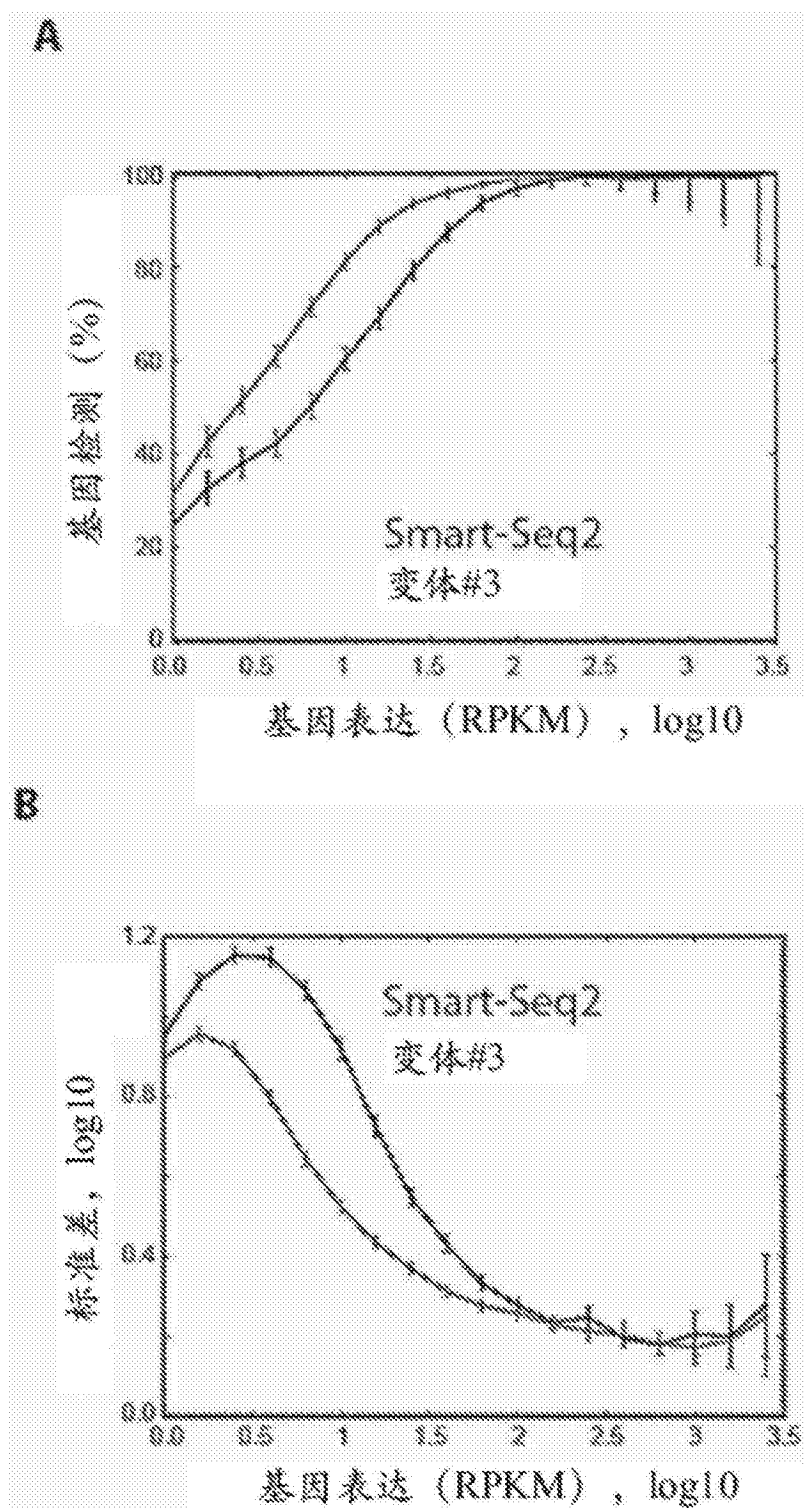


图9

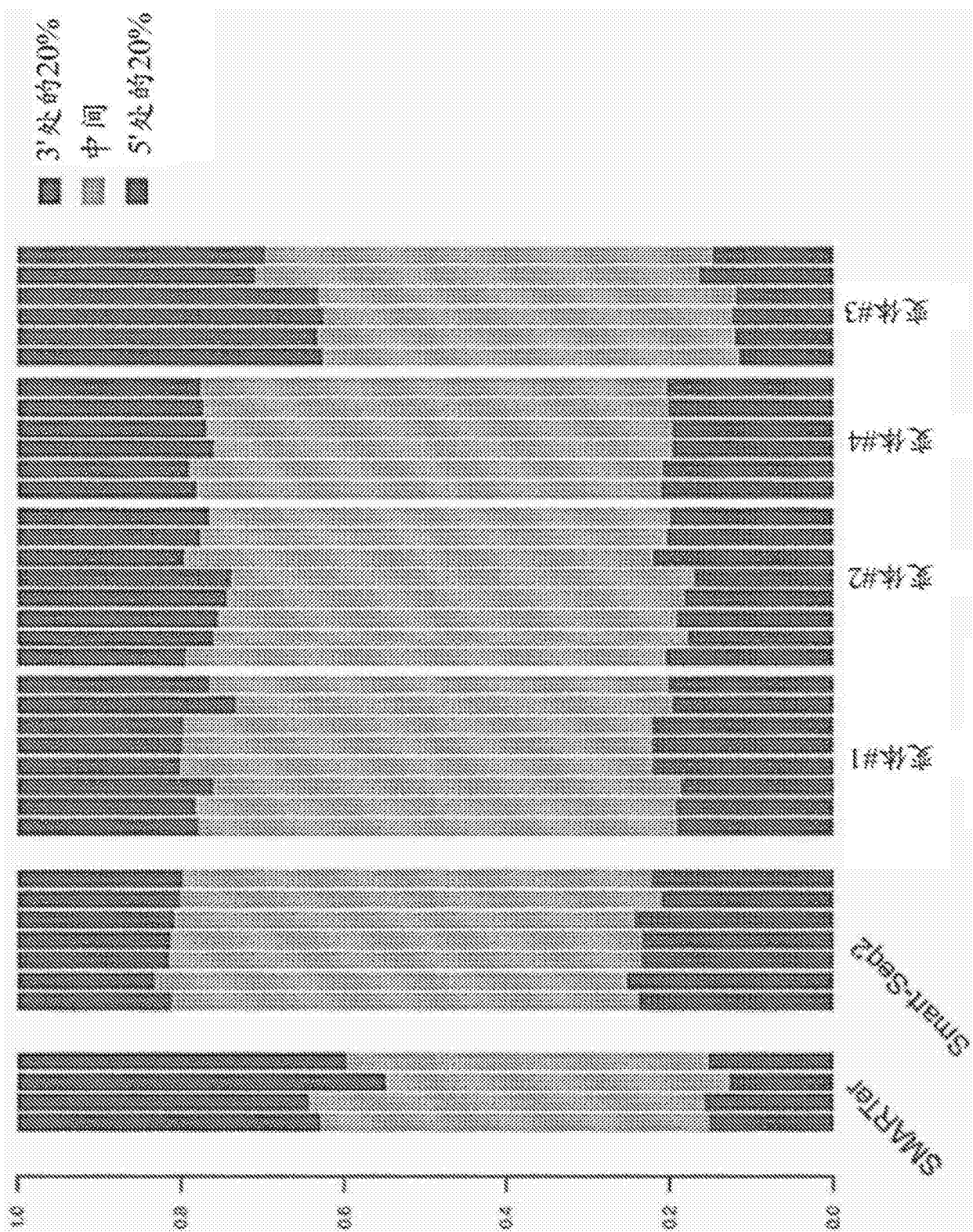


图10

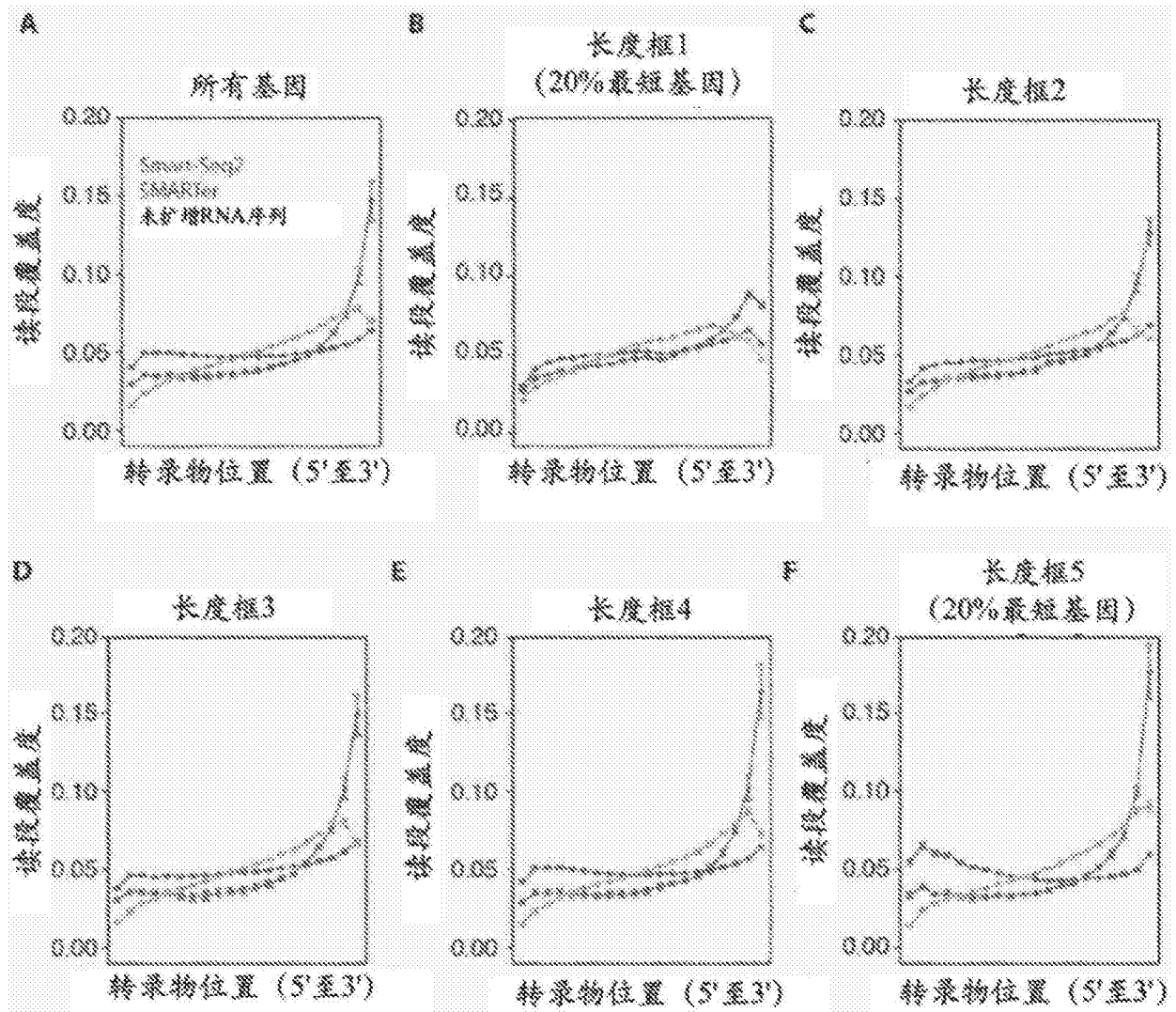


图11

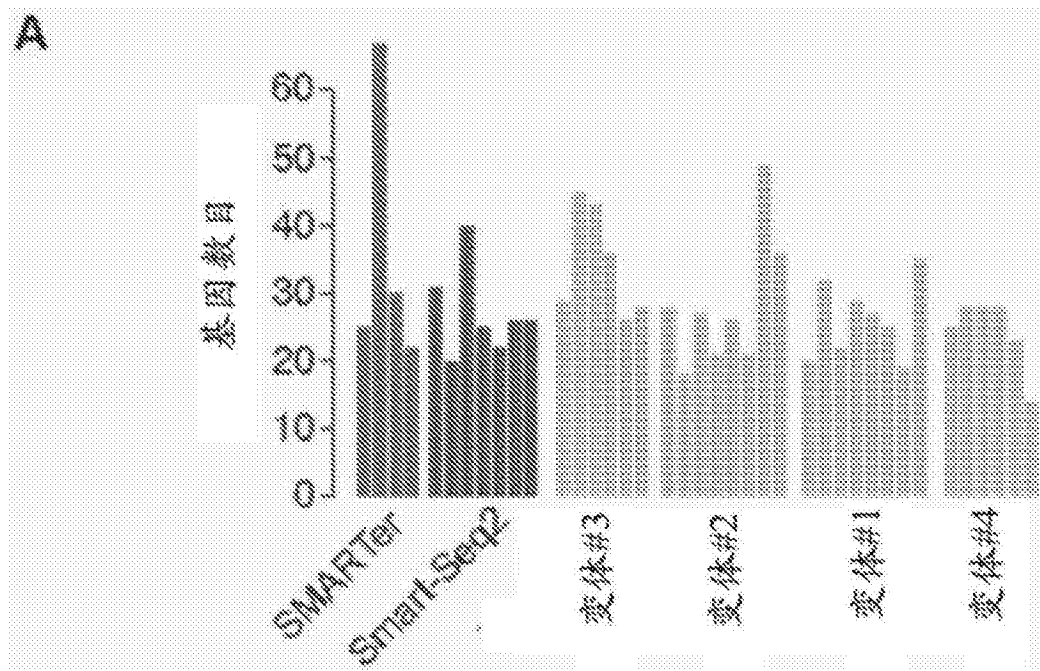


图12A

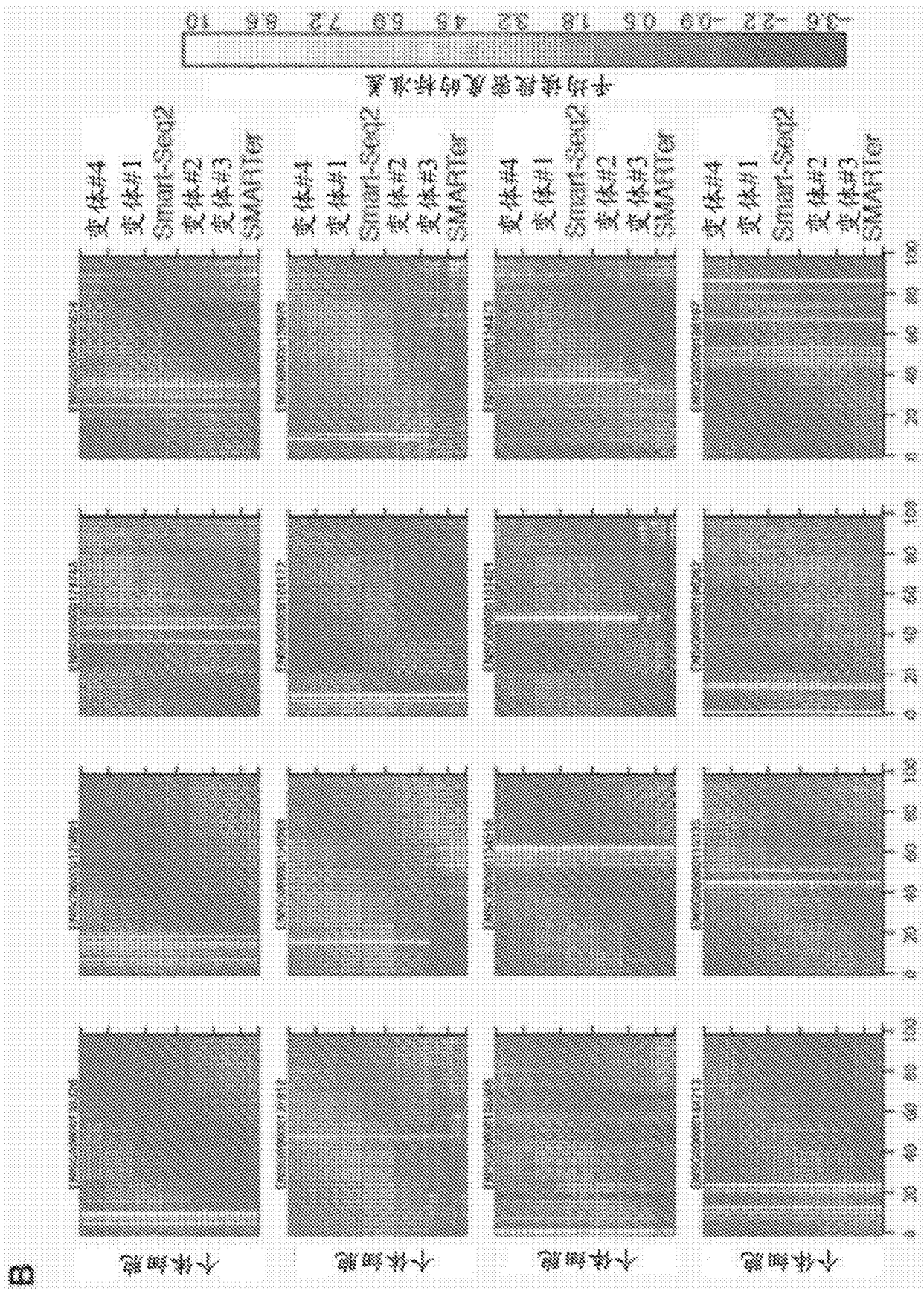


图12(续)

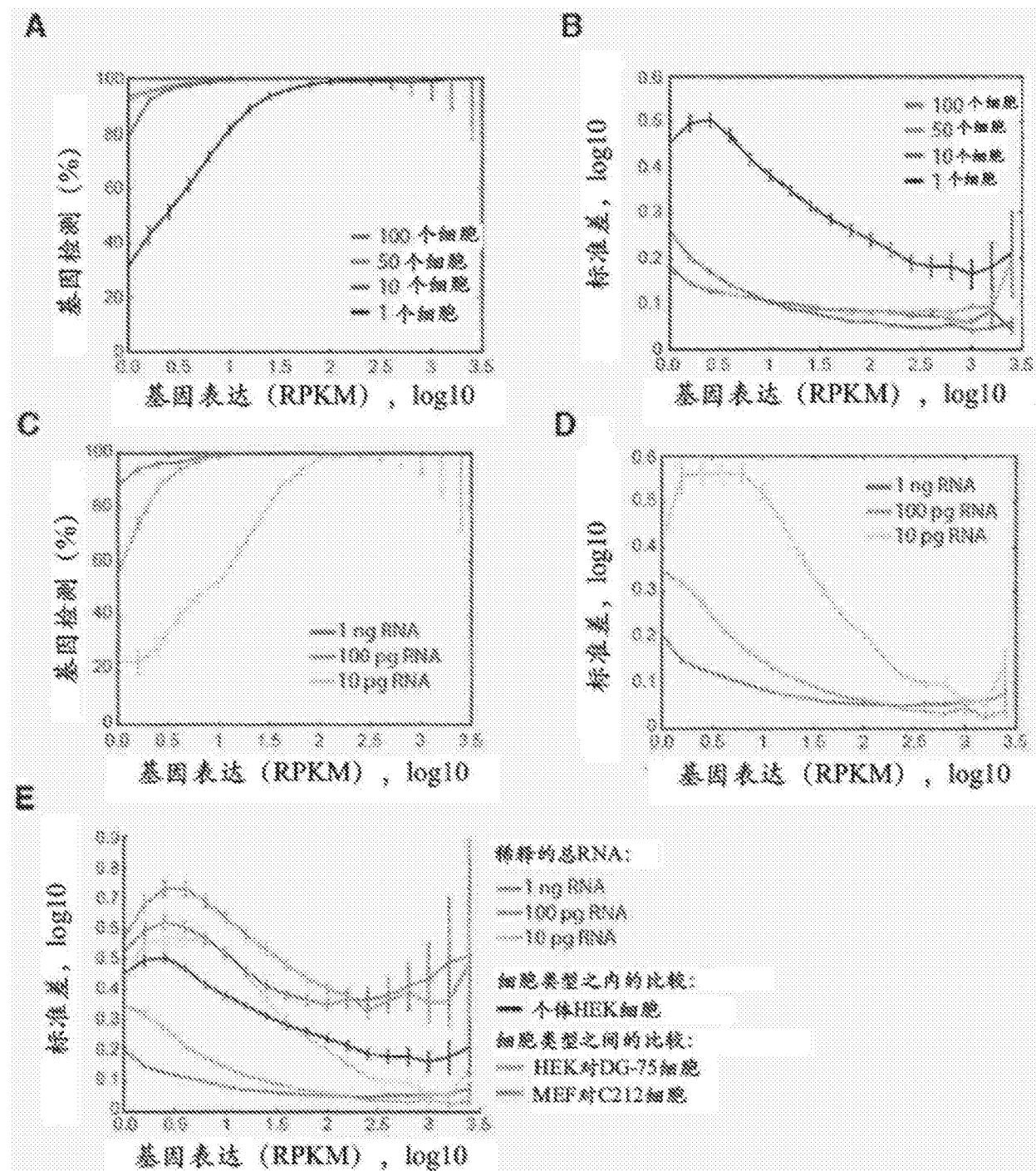
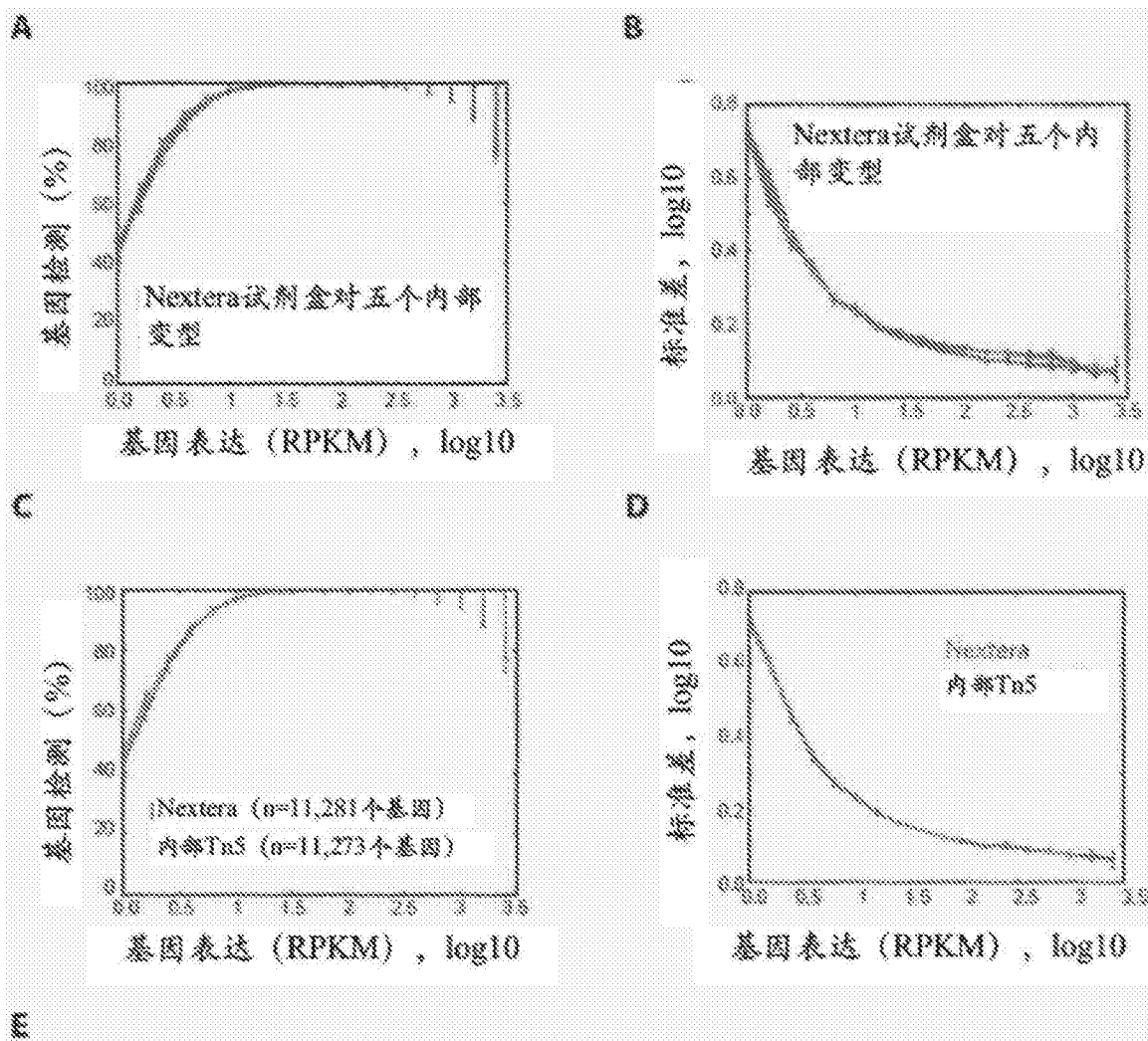


图13



SDS百分比是指其在50 μl PCR反应液中的最终浓度

图14