

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2025 年 6 月 26 日 (26.06.2025)



(10) 国际公布号
WO 2025/129403 A1

(51) 国际专利分类号:

C12Q 1/6869 (2018.01)

(21) 国际申请号:

PCT/CN2023/139573

(22) 国际申请日:

2023 年 12 月 18 日 (18.12.2023)

(25) 申请语言:

中文

(26) 公布语言:

中文

(71) 申请人: 深圳华大生命科学研究院 (BGI SHENZHEN) [CN/CN]; 中国广东省深圳市盐田区盐田街道北山工业区综合楼 518083 (CN)。

(72) 发明人: 黎雪蓉(LI, Xuerong); 中国广东省深圳市盐田区盐田街道北山工业区综合楼 518083 (CN)。刘畅(LIU, Chang); 中国广东省深圳市盐田区盐田街道北山工业区综合楼 518083 (CN)。林秀妹(LIN, Xiumei); 中国广东省深圳市盐田区盐田街道北山工业区综合楼 518083 (CN)。刘传宇(LIU, Chuanyu); 中国广东省深圳市盐田区盐田街道北山工业区综合楼 518083 (CN)。罗焜月(LUO, Kunyue); 中国广东省深圳市盐田区盐田街道北山工业区综合楼 518083 (CN)。宋雨默(SONG, Yumo); 中国广东省深圳市盐田区盐田街道北山工业区综合楼 518083 (CN)。刘龙奇(LIU, Longqi); 中国广东省深圳市盐田区盐田街道北山工业区综合楼 518083 (CN)。

(74) 代理人: 北京知帆远景知识产权代理有限公司 (ZHIFAN & PARTNERS); 中国北京市海淀区阜成路73号裕惠大厦B座805 100142 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ,

IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

— 包括国际检索报告(条约第21条(3))。

(54) Title: DROPLET PCR-BASED AMPLIFICATION, LIBRARY CONSTRUCTION AND SEQUENCING METHODS

(54) 发明名称: 基于液滴的PCR扩增、建库及测序方法

(57) Abstract: Methods for amplification, library construction and high-throughput sequencing, based on droplet PCR. The droplet PCR-based amplification method comprises: encapsulating a single cell of a sample to be tested with an oil droplet, to obtain a single cell oil droplet of the sample to be tested; and performing PCR amplification on the single cell oil droplet of the sample to be tested, the single cell of the sample to be tested being provided in the form of a cell suspension, the cell suspension comprising the single cell of the sample to be tested and a first buffer, the first buffer comprising FS, and the FS comprising Tris-HCl, NaCl and MgCl₂.

(57) 摘要: 一种基于液滴PCR的扩增、建库以及高通量测序方法。所述基于液滴PCR的扩增方法包括: 将待测样本单细胞进行油滴包裹处理, 以便获得待测样本单细胞油滴; 以及将所述待测样本单细胞油滴进行PCR扩增处理; 其中, 所述待测样本单细胞是以细胞悬液的形式提供的, 所述细胞悬液包括所述待测样本单细胞和第一缓冲液, 所述第一缓冲液包括FS, 所述FS包括Tris-HCl、NaCl和MgCl₂。



WO 2025/129403 A1

说明书

发明名称: 基于液滴的PCR扩增、建库及测序方法

技术领域

[0001] 本申请属于生物技术领域,具体地,涉及单细胞测序领域,更具体地,涉及一种基于液滴的PCR扩增、建库及测序方法。

背景技术

[0002] 单细胞转录组测序(scRNA-seq)技术是一种在单个细胞水平上检测细胞基因等信息的技术,可用于揭示组织内细胞异质性、发育和分化状态,并在生物医学临床研究和生命科学科研中广泛应用。然而,由于该技术需要对单细胞进行裂解,导致提取的RNA量较少。

[0003] 逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)是一种常规的检测技术,可用于靶向RNA样本,并从中扩增特定RNA样本的丰度,对于病毒RNA的检测具有极高的应用价值。近年来,将液滴高通量技术与RT-PCR技术结合,应用于临床检测,可以提高检测的灵敏度及通量,例如在废水中新冠SARS-CoV-2突变体的检测中得到了广泛应用(Heijnen,Leo et al. “Droplet digital RT-PCR to detect SARS-CoV-2 signature mutations of variants of concern in wastewater.” The Science of the total environment vol.799(2021):149456.)。

[0004] 然而,现有技术主要集中在检测特定基因信息方面,无法应用于高通量的单细胞转录组技术。此外,一些现有技术也存在半透膜选择性不准确及难以纯化等问题。

[0005] 因此,目前需要开发一种基于液滴RT-PCR的高通量单细胞转录组测序技术,实现高通量的单细胞转录组检测。

[0006] 发明内容

[0007] 本申请是基于发明人对以下问题的发现和认识所作出的:

[0008] 发明人发现,一方面,目前液滴内RT-PCR技术存在局限性。首先,由于液滴的体积较小,在每个液滴中进行RT-PCR扩增会导致不完全的扩增反应(只能截留大于300bp的核酸物质),导致得到的转录本信息不完整。其次,该技术只能检

测特定的基因，无法获得细胞中全面的转录本信息。这些局限性可能会影响该技术在临床医学中的应用。

[0009] 另一方面，基于微孔板的单细胞测序技术通常使用微型反应器来进行单细胞RT-PCR扩增(如10x Genomics)。然而，由于微孔板中的很多微小反应器是难以控制的，在实现高通量上存在困难。此外，与液滴内RT-PCR技术相比，这种方法的成本也较高。

[0010] 因此，发明人基于5'端的液滴技术，在液滴内进行逆转录获得cDNA，同时在液滴中进行扩增，将PCR后的产物进行纯化后进行建库与测序。在液滴内一步逆转录和扩增不仅提高了通量也简化了操作步骤和缩短了时间，还降低了成本。

[0011] 为此，基于上述发现，在本申请的第一方面，本申请提出了一种基于液滴的PCR扩增方法。根据本发明的实施例，所述方法包括：将待测样本单细胞进行油滴包裹处理，以便获得待测样本单细胞油滴；以及将所述油滴内的待测样本单细胞进行PCR扩增处理；其中，所述待测样本单细胞是以细胞悬液的形式提供的，所述细胞悬液包括所述待测样本单细胞和第一缓冲液，所述第一缓冲液包括FS，所述FS包括Tris-HCl、NaCl和MgCl₂。根据本申请的实施例，本方法可以全面获取细胞中的转录本信息。通过在第一缓冲液中添加逆转录酶，实现了RT-PCR的一步完成，不仅提高了处理样本的速度，还简化了操作步骤，缩短了实验时间，同时也降低了实验成本。

[0012] 根据本申请的实施例，上述方法还可以进一步包括如下附加技术特征至少之一：

[0013] 根据本申请的实施例，所述Tris-HCl在所述第一缓冲液中的浓度为20 ~ 30mM。在本申请的一些示例中，所述Tris-HCl在第一缓冲液中的浓度可选地为20mM、21mM、22mM、23mM、24mM、25mM、26mM、27mM、28mM、29mM或30mM。在本申请的一些优选示例中，Tris-HCl在第一缓冲液中的浓度为25mM时，PCR反应的稳定性和特异性更好。

[0014] 根据本申请的实施例，所述NaCl在所述第一缓冲液中的浓度为25 ~ 75mM。在本申请的一些示例中，所述NaCl在第一缓冲液中的浓

度可选地为25mM、30mM、35mM、40mM、41mM、44mM、43mM、44mM、45mM、46mM、47mM、48mM、49mM、50mM、51mM、55mM、53mM、55mM、55mM、56mM、57mM、58mM、59mM、60mM、65mM、70mM或75mM。在本申请的一些优选示例中，NaCl在第一缓冲液中的浓度为50mM时，能够避免引物的非特异性结合。

[0015] 根据本申请的实施例，所述MgCl₂在所述第一缓冲液中的浓度为3~8mM。在本申请的一些示例中，所述MgCl₂在第一缓冲液中的浓度可选地为3mM、4mM、5mM、6mM、7mM或8mM。在本申请的一些优选示例中，MgCl₂在第一缓冲液中的浓度为5mM时，可以增加PCR产物的特异性和扩增效率。

[0016] 根据本申请的实施例，所述第一缓冲液进一步包括甜菜碱、dNTP、dCTP、三羟丙基膦、核酸酶抑制剂、S2引物(cDNA扩增引物)和KAPA高保真DNA聚合酶。发明人通过在第一缓冲液中增加dCTP，确保逆转录反应的充分进行。

[0017] 根据本申请的实施例，所述甜菜碱在第一缓冲液中的终浓度为0.5~2M。在本申请的一些示例中，所述甜菜碱在第一缓冲液中的终浓度可选地为0.5M、1M、1.5M或2M。在本申请的一些优选示例中，所述甜菜碱在第一缓冲液中的终浓度为1M。

[0018] 根据本申请的实施例，所述dNTP在第一缓冲液中的终浓度为0.2~2mM。在本申请的一些示例中，所述dNTP在第一缓冲液中的终浓度可选地为0.2mM、0.5mM、1mM、1.5mM或2mM。在本申请的一些优选示例中，所述dNTP在第一缓冲液中的终浓度可选地为1mM。

[0019] 根据本申请的实施例，所述dCTP在第一缓冲液中的终浓度为1~5mM。在本申请的一些示例中，所述dCTP在第一缓冲液中的终浓度可选地为1mM、2mM、3mM、4mM或5mM。在本申请的一些优选示例中，所述dCTP在第一缓冲液中的终浓度可选地为5mM。

[0020] 根据本申请的实施例，所述KAPA高保真DNA聚合酶在第一缓冲液中的终浓度为0.01~0.03U/ μ L。在本申请的一些示例中，所述KAPA高保真DNA聚合酶在第一缓冲液中的终浓度可选地为0.01U/ μ L、0.02U/ μ L或0.03U/ μ L。在本申请

的一些优选实施例中，所述KAPA高保真DNA聚合酶在第一缓冲液中的终浓度为0.02U/ μ L。

[0021] 根据本申请的实施例，所述三羟丙基膦在第一缓冲液中的终浓度为0.01 ~ 0.03M。在本申请的一些示例中，所述三羟丙基膦在第一缓冲液中的终浓度可选地为0.01M、0.02M或0.03M。在本申请的一些优选示例中，所述三羟丙基膦在第一缓冲液中的终浓度为0.01M。

[0022] 根据本申请的实施例，所述核酸酶抑制剂在第一缓冲液中的终浓度为1 ~ 3U/ μ L。在本申请的一些示例中，所述核酸酶抑制剂在第一缓冲液中的终浓度可选地为1U/ μ L、1U/ μ L或3U/ μ L。在本申请的一些优选示例中，所述核酸酶抑制剂在第一缓冲液中的终浓度为1U/ μ L。

[0023] 根据本申请的实施例，所述S2引物在第一缓冲液中的终浓度为0.6 ~ 1.2 μ M。在本申请的一些示例中，所述S2引物在第一缓冲液中的终浓度可选地为0.6 μ M、0.7 μ M、0.8 μ M、0.9 μ M、1 μ M、1.1 μ M或1.2 μ M。在本申请的一些优选示例中，所述S2引物在第一缓冲液中的终浓度为0.9 μ M。

[0024] 根据本申请的实施例，所述第一缓冲液进一步包括：SSIV逆转录酶；所述SSIV逆转录酶在第一缓冲液中的终浓度为3 ~ 5U/ μ L。在本申请的一些示例中，所述SSIV逆转录酶在第一缓冲液中的终浓度可选地为3U/ μ L、3.5U/ μ L、4U/ μ L、4.5U/ μ L或5U/ μ L。在本申请的一些优选示例中，所述SSIV逆转录酶在第一缓冲液中的终浓度为4.5U/ μ L。根据本申请的实施例，在所述第一缓冲液中添加SSIV逆转录酶可以在液滴内一步进行RT-PCR反应，减少操作步骤，节省时间和成本。

[0025] 根据本申请的实施例，所述第一缓冲液进一步包括：二硫苏糖醇(DTT)；所述二硫苏糖醇在第一缓冲液中的终浓度为0.01 ~ 0.03M。在本申请的一些示例中，所述二硫苏糖醇在第一缓冲液中的终浓度可选地为0.01M、0.02M或0.03M。在本申请的一些优选示例中，所述二硫苏糖醇在第一缓冲液中的终浓度为0.01M。根据本申请的实施例，在RT-PCR中，DTT主要用于还原RNA分子内的二硫键，使其变为单硫键，从而使RNA分子更容易结构解开，便于逆转录酶的作用。

用。DTT还能使热稳定逆转录酶在高温下保持活性，并使RNA模板不发生降解或形成复杂二级结构，从而增加cDNA合成过程中的效率和精度。

[0026] 根据本申请的实施例，所述第一缓冲液进一步包括：Poly dT；所述Poly dT在第一缓冲液中的终浓度为1 ~ 4 μ M。在本申请的一些示例中，所述Poly dT在第一缓冲液中的终浓度可选地为1 μ M、1.5 μ M、2 μ M、2.5 μ M、3 μ M、3.5 μ M或4 μ M。在本申请的一些优选示例中，所述Poly dT在第一缓冲液中的终浓度为2.5 μ M。根据本申请的实施例，在RT-PCR中，Poly dT主要用于捕获mRNA分子，将其作为模板进行逆转录反应，从而转录成cDNA。

[0027] 根据本申请的实施例，所述油滴包裹处理是通过如下方式进行的：将待测样本单细胞悬液、微珠悬液以及液滴形成油进行混合处理。

[0028] 示例性地，采用汽化部件使所述单细胞悬液汽化并快速推入所述液滴形成油中，以形成PCR液滴。

[0029] 根据本申请的实施例，所述微珠悬液包括微珠和第二缓冲液，所述第二缓冲液包括FS，所述FS包括Tris-HCl、NaCl和MgCl₂。

[0030] 根据本申请的实施例，所述Tris-HCl在所述第一缓冲液中的浓度为20 ~ 30mM。在本申请的一些示例中，所述Tris-HCl在第一缓冲液中的浓度可选地为20mM、21mM、22mM、23mM、24mM、25mM、26mM、27mM、28mM、29mM或30mM。在本申请的一些优选示例中，Tris-HCl在第一缓冲液中的浓度为25mM时，PCR反应的稳定性和特异性更好。

[0031] 根据本申请的实施例，所述NaCl在所述第一缓冲液中的浓度为40 ~ 60mM。在本申请的一些示例中，所述NaCl在第一缓冲液中的浓度可选地为40mM、41mM、44mM、43mM、44mM、45mM、46mM、47mM、48mM、49mM、50mM、51mM、55mM、53mM、55mM、55mM、56mM、57mM、58mM、59mM或60mM。在本申请的一些优选示例中，NaCl在第一缓冲液中的浓度为50mM时，能够避免引物的非特异性结合。

[0032] 根据本申请的实施例，所述MgCl₂在所述第一缓冲液中的浓度为3 ~ 8mM。在本申请的一些示例中，所述MgCl₂在第一缓冲液中的浓度可选地为3mM

、4mM、5mM、6mM、7mM或8mM。在本申请的一些优选示例中，MgCl₂在第一缓冲液中的浓度为5mM时，可以增加PCR产物的特异性和扩增效率。

[0033] 根据本申请的实施例，所述第二缓冲液进一步包括：曲拉通X-100、洋地黄皂苷和ficoll。

[0034] 根据本申请的实施例，所述曲拉通X-100在所述第二缓冲液中的浓度为0.1~0.3%(w/v)。在本申请的一些示例中，所述曲拉通X-100在所述第二缓冲液中的浓度可选地为0.1%(w/v)、0.2%(w/v)或0.3%(w/v)。在本申请的一些优选示例中，所述曲拉通X-100在所述第二缓冲液中的浓度为0.1%(w/v)。

[0035] 根据本申请的实施例，所述洋地黄皂苷在所述第二缓冲液中的浓度为0.001~0.003%(w/v)。在本申请的一些示例中，所述洋地黄皂苷在所述第二缓冲液中的浓度可选地为0.01%(w/v)、0.015%(w/v)、0.02%(w/v)、0.025%(w/v)或0.03%(w/v)。在本申请的一些优选示例中，所述洋地黄皂苷在所述第二缓冲液中的浓度为0.025%(w/v)。

[0036] 根据本申请的实施例，所述ficoll水溶液在所述第二缓冲液中的终浓度为2~10%(w/v)。在本申请的一些示例中，所述ficoll水溶液在所述第二缓冲液中的终浓度可选地为1%(w/v)、2%(w/v)、3%(w/v)、4%(w/v)、5%(w/v)、6%(w/v)、7%(w/v)、8%(w/v)、9%(w/v)或10%(w/v)。在本申请的一些优选示例中，所述ficoll水溶液在所述第二缓冲液中的终浓度为4%(w/v)。根据本申请的实施例，添加Ficol可以使细胞和磁珠在跑液滴的过程中不易下沉，进而不会造成堵塞微流控通道。

[0037] 在本申请的第二方面，本申请提出了一种测序文库构建方法。根据本申请的实施例，所述方法包括：基于本发明第一方面所述的方法对待测样本进行PCR扩增反应，以便获得扩增产物，所述扩增产物构成所述测序文库。根据本申请的实施例，利用上述液滴内RT-PCR方法进行测序文库构建可以简化操作步骤并缩短建库时间，节约成本。

[0038] 根据本申请的实施例，所述方法进一步包括将所述扩增产物进行破乳处理和片段化处理；以及将片段化处理产物与测序接头进行连接处理。根据本申请的实

施例，通过进行破乳处理，以便释放扩增后的PCR产物。将所述PCR产物进行打断处理，然后连接测序接头，以便形成测序文库。

[0039] 根据本申请的实施例，所述破乳处理是通过如下步骤进行的：将扩增产物与表面活性剂(例如PFO或辛烷基磺酸钠)进行混合处理，以便获得破乳处理产物。在本申请的一个示例中，将扩增产物与PFO(Sigma-Aldrich,货号：370533-25G)进行混合处理，并将混合处理产物在1000g下离心2分钟，以便获得破乳处理产物。在本申请的一些示例中，添加表面活性剂以便对油性液滴进行破乳。

[0040] 需要说明的是，所述表面活性剂可根据实验需求自由选择，在本申请中不作具体限制。

[0041] 根据本申请的实施例，所述片段化处理是在片段化酶存在条件下进行的。

[0042] 在本申请的第三方面，本申请提出了一种测序文库。根据本申请的实施例，所述测序文库是通过本发明第二方面所述的方法获得的。根据本申请的实施例，基于本申请第二方面所述方法可以快速构建测序文库。

[0043] 在本申请的第四方面，本申请提出了一种对目标核酸分子进行测序的方法。根据本申请的实施例，所述方法包括：针对目标序列，根据本发明第三方面所述的方法，构建测序文库；针对所述测序文库进行测序，以便获得测序结果；和基于所述测序结果，确定所述目标核酸分子的核酸序列。根据本申请的实施例，基于本申请所述方法构建可用于高通量测序的文库，减少了人工操作步骤，缩短了时间，也降低了成本。

[0044] 在本申请的第五方面，本申请提出了一种液滴PCR扩增试剂盒。根据本申请的实施例，所述试剂盒包括：本发明第一方面所述方法中限定的第一缓冲液和第二缓冲液；和液滴生成油。根据本申请的实施例，所述试剂盒能够快速进行PCR扩增，操作简便，成本较低。在液滴内可完成逆转录和PCR扩增两种反应，相比于以往的扩增方法更加高效。

[0045] 根据本申请的实施例，上述试剂盒还可以进一步包括如下附加技术特征至少之一：

[0046] 根据本申请的实施例，所述试剂盒进一步包括消化酶和说明书中的至少之一。

[0047] 本发明的附加方面和优点将在下面的描述中部分给出，部分将从下面的描述中变得明显，或通过本发明的实践了解到。

附图说明

[0048] 本发明的上述和/或附加的方面和优点从结合下面附图对实施例的描述中将变得明显和容易理解，其中：

[0049] 图1为根据本发明实施例所述的1-1实验组测序质检报告结果示意图；

[0050] 图2为根据本发明实施例所述的1-2实验组测序质检报告结果示意图；

[0051] 图3为根据本发明实施例所述的2-1实验组测序质检报告结果示意图；

[0052] 图4为根据本发明实施例所述的2-2实验组测序质检报告结果示意图；

[0053] 图5为根据本发明实施例所述的1-1实验组5xFS buffer中为钠离子时的PCR扩增产物2100片段分布示意图；其中，5XFS组分为：125mM Tris-HCl, 250mM NaCl, 25mM MgCl₂；

[0054] 图6为根据本发明实施例所述的2-1实验组5xFS buffer中为钾离子时的PCR扩增产物2100片段分布示意图；其中，5XFS组分为：125mM Tris-HCl, 250mM NaCl, 25mM MgCl₂；

[0055] 图7为根据本发明实施例所述的测试不同盐离子浓度的PCR扩增产物2100片段分布示意图；RP1-4表示实验组1-4 PCR扩增产物2100片段分布图；RP2-4表示实验组2-4 PCR扩增产物2100片段分布图；RP3-4表示实验组3-4 PCR扩增产物2100片段分布图；RP4-4表示实验组4-4 PCR扩增产物2100片段分布图；

[0056] 图8为根据本发明实施例所述的液滴生成示意图。

具体实施方式

[0057] 下面详细描述本发明的实施例，所述实施例的示例在附图中示出。下面通过参考附图描述的实施例是示例性的，旨在用于解释本发明，而不能理解为对本发明的限制。

[0058] 与本申请相关的现有技术：

[0059] 目前将液滴RT-PCR应用于单细胞特定基因的检测是利用特定的材料形成一种类似于半透膜样的液滴，该液滴的半透膜具有选择透过性，可以实现将细

胞封装在液滴后进行细胞的裂解释放特定的核酸物质，然后进行换液，将裂解液去除后再进行RT-PCR反应(Leonaviciene,Greta,and Linas Mazutis. “RNA cytometry of single-cells using semi-permeable microcapsules.” *Nucleic acids research* vol.51,1(2023):e2.doi:10.1093/nar/gkac918)。其优点在于它可以将裂解液对酶的抑制效果移除，从而不影响后续的反应。但也有明显的缺点，一方面，半透膜只能截留大于300bp的核酸物质，而应用于高通量的标记的引物均小于300bp，因此会自由穿梭无法进行液滴的标记；另一方面是形成半透膜的液滴不容易被破坏，因此无法通过纯化获得整个细胞转录本的信息。它目前主要的应用还是在于检测特定的基因信息，无法应用于高通量的单细胞转录组技术。

[0060] 目前能够将RT-PCR应用于单细胞转录组测序的，基本是基于单管的技术。由于单管可以使用高温裂解，将孔板中的细胞进行加热裂解后，再加入RT-PCR的反应试剂，因此解决了裂解与RT高度不相融的问题。如smart-seq3和Flash-seq，它们都是基于孔板进行(Hagemann-Jensen,M.,Ziegenhain,C.,Chen,P.,Ramsköld,D.,Hendriks,G.J.,Larsson,A.J.M.,Faridani,O.R.,&Sandberg,R.(2020).Single-cell RNA counting at allele and isoform resolution using Smart-seq3.*Nature biotechnology*,38(6),708-714.; Hahaut,V.,Pavlinic,D.,Carbone,W.,Schuierer,S.,Balmer,P.,Quinodoz,M.,Renner,M.,Roma,G.,Cowan,C.S.,&Picelli,S.(2022).Fast and highly sensitive full-length single-cell RNA sequencing using FLASH-seq.*Nature biotechnology*,40(10),1447-1451.)。它们虽然在一定程度上简化了单细胞建库的流程，如FLASH-seq更是将整个建库过程缩短至4.5h。虽然在时间成本上有了明显的改善，但基于孔板的技术较难兼顾高通量。

[0061] 基于液滴PCR的扩增方法

[0062] 因此，本申请基于上述现有技术的缺陷，开发出一种基于液滴PCR的扩增方法。所述方法包括：将待测样本单细胞进行油滴包裹处理，以便获得待测样本单细胞油滴；以及将所述待测样本单细胞油滴进行PCR扩增处理；其中，所述待测样本单细胞是以细胞悬液的形式提供的，所述细胞悬液包括所述待测样本单细胞和第一缓冲液，所述第一缓冲液包括FS，所述FS包括Tris-HCl、NaCl和MgCl₂。

[0063] 根据本申请的实施例，可以在所述第一缓冲液中加入逆转录酶、DTT(二硫苏糖醇)以及Poly dT，可以实现逆转录和PCR扩增的一步液滴内反应。不仅能够实现高通量，还极大简化实验步骤，缩短反应时间。还能够节约实验成本。本申请所述方法相比以往应用于临床检测的液滴RT-PCR(ddRT-PCR)与基于孔板的单细胞RT-PCR转录组技术，既可以获得一个单细胞完整的转录本信息，又可以快速的实现高通量，可为未来自动化建库的应用提供研究基础。因此本申请对未来单细胞高通量转录组测序技术的发展有明显的优势和应用价值。

[0064] 具体的，为了方便理解，下面对上述方法技术方案进行详细解释和说明。

[0065] 1、制备单细胞悬液：将组织进行消化(研磨或消化酶)，在PBS中进行(含0.04%BSA)清洗，细胞筛过滤后在细胞第一缓冲液(配方见表1)中进行重悬，获得单细胞悬液；

[0066] 2、制备微珠：将配制好的bead buffer(微珠缓冲液，配制方法见表3)先重悬index carrier(用于标记样本的短DNA序列)，充分混匀后重悬cell bead(细胞微珠)，充分混匀；

[0067] 需要说明的是，微珠在制备时已分别连上barcode1，barcode2，UMI和TSO引物(rGrGrG)序列。

[0068] 3、液滴生成：将液滴生成油、细胞悬液(步骤1制备得到)以及细胞微珠(步骤2制备得到)进行混合处理后转移至PCR管(也可选择八连管)中，使用矿物油覆盖后，上机进行PCR反应；

[0069] 需要说明的是，在跑液滴时，细胞裂解后mRNA会被poly dT捕获，还原剂(DTT等)将磁珠表面的oligo(DNA引物)释放到液滴中。在RT酶(逆转录酶)作用下以mRNA为模版进行逆转录反应，合成第一条cDNA链，并在第一链末端加上CCC，磁珠上的引物与CCC杂交而被带标记的oligo捕获，并完成模版转换，而后进行95℃解链，以第一条cDNA链为模版合成互补配对第二条cDNA链，通过两端的PCR引物进行PCR反应，将目的片段进行扩增。

[0070] 测序文库构建方法

[0071] 在本申请的第二方面，本申请提出了一种测序文库的构建方法。根据本申请的实施例，基于上述液滴PCR的扩增方法对待测样本进行PCR扩增反应，以便获得扩增产物，所述扩增产物构成所述测序文库。

[0072] 需要说明的是，在进行上述PCR扩增后，对扩增后的细胞油滴进行破乳处理，释放扩增后的cDNA。对扩增后的cDNA进行纯化(除去杂质，如PCR引物、盐，缓冲液等)，对纯化产物进行片段化处理(一般采用片段化酶，也可使用其他方法进行打断处理)，并进行接头连接以及单链环化处理后完成测序文库的构建。

[0073] 测序文库

[0074] 在本申请的第三方面，本申请提出了一种测序文库。根据本申请的实施例，所述测序文库是通过上述方法构建获得。

[0075] 对目标核酸分子进行测序的方法

[0076] 在本申请的第四方面，本申请提出了一种对目标核酸分子进行测序的方法。根据本申请的实施例，所述方法是通过对上述构建的测序文库在测序平台上进行高通量测序。

[0077] 需要说明的是，所述测序平台并不特别限制，可以是任何常见的一代、二代或者三代测序平台。

[0078] 液滴PCR扩增试剂盒

[0079] 在本申请的第五方面，本申请提出了一种液滴PCR扩增试剂盒。根据本申请的实施例，所述试剂盒包括：消化酶；第一方面的第一缓冲液和第二缓冲液；以及液滴生成油。

[0080] 根据本申请的实施例，所述试剂盒在科研或医学应用中更加方便快捷，而且可进一步进行RT-PCR反应，减少人工操作，样品污染风险更低，而且扩增速度相对于传统PCR更快。

[0081] 下面将结合具体实施例对本发明进行进一步解释说明。下述实施例中所使用的实验方法如无特殊说明，均为常规方法。下述实施例中所用的材料、试剂等，如无特殊说明，均可从商业途径得到。

[0082] 实施例1：基于液滴RT-PCR的高通量单细胞转录组测序流程

[0083] 1、单细胞悬液准备

- [0084] 1.1对人293T细胞系和鼠3T3细胞系进行复苏后制备单细胞悬液，并用PBS(含0.04%BSA)清洗1–2次，并使用孔径为40 μ m的细胞筛过滤；
- [0085] 1.2使用细胞计数板或计数仪检测细胞(或细胞核)的浓度；
- [0086] 1.3根据细胞浓度，吸取约2.2万个细胞(或细胞核)，300–500g，4℃，5min离心收集细胞沉淀，加入100 μ L Cell Resuspension Buffer(细胞重悬缓冲液，配制方法见表1)重悬细胞(或细胞核)。
- [0087] 表1：细胞重悬缓冲液配置

试剂	体积 (μL)
5X FS	22
5 M 甜菜碱 (Betaine)	22

10 mM dNTP	11
100 mM dCTP	5.5
100 μM PolydT	5.5
1 M 二硫苏糖醇 (DTT)	2.2
1 M 三羟丙基膦 (CR)	2.2
核酸酶抑制剂 (RNase inhibitor, 40 U/μL)	5.5
PBS 缓冲液 (含 40% Ficoll)	11
SSIV 反转录酶 (SSIV reverse transcriptase, 200 U/μL)	5
S2 引物 (primer, 20 uM)	10
KAPA 高保真 DNA 聚合酶 (HiFi DNA Polymerase, 1U/μL)	5
PBS (含 0.04% BSA)	0.5
细胞	4
总计	111.3

- [0088] 注：5X FS的配制：125mM Tris–HCl，250mM NaCl，25mM MgCl₂。
- [0089] 其中，配制上述缓冲液的试剂厂家、货号如表2所示。
- [0090] 表2：

试剂	品牌	货号
SuperScript IV reverse transcriptase (SSIV 反转录酶)	THERMO SCIENTIFIC	18090050
Smearase Buffer (片段化酶缓冲液)	YEASEN	13474ES96
Smearase Enzyme (片段化酶)		12626ES96
5×Novel Ligation Buffer(新型连接酶缓冲液)		
Novel T4 DNA Ligase (新型 T4 DNA 连接酶)		
Betaine solution (甜菜碱溶液)	SIGMA	B0300-5VL
dCTP (100 mM)	LIFE TECHNOLOGIES	10217-016
dNTP(10mM)	NEB	N0447L
KAPA HiFi DNA Polymerase with dNTPs (含 dNTP 的 KAPA 高保真 DNA 聚合酶, 250 U)	KAPA	KK2102
Digitonin (洋地黄皂苷)	SIGMA	D141-100MG
Ficoll PM 400 (密度梯度分离液)	CytivaBR00973	17030050

- [0091] 2、微珠准备
- [0092] 2.1吸取35万个磁珠和250万index carrier(用于标记样本的短DNA序列)到两个0.2mL PCR管中，放在磁力架上静置2min，去上清；
- [0093] 2.2从磁力架取下PCR管，将配制好的bead buffer(微珠缓冲液，配制方法见表3)先重悬index carrier，充分混匀后重悬cell bead(细胞微珠)，充分混匀。
- [0094] 表3：

试剂	体积 (μL)
5X FS (同表 1)	22
5 M Betaine (甜菜碱)	22
10 mM dNTP	11
100 mM dCTP	5.5
10% Triton X-100 (曲拉通 X-100)	2.2
1% digitonin (洋地黄皂苷)	5.5
40% ficol 水溶液	11
NF H ₂ O (无酶水)	30.8
Total (总计)	110

[0095] 3、液滴生成(图8)

[0096] 3.1将芯片表面保护膜撕掉，放置于液滴发生装置的芯片槽区域；

[0097] 3.2将收集盖子上的连接管A端(接触收集管底部的连接管)插入芯片的Outlet孔；

[0098] 3.3将30ml注射器放置在固定架，并调节推杆到初始位置17mL刻度。用平口针头连接注射器和收集管盖子上的连接管B端(非接触收集管底部的连接管)；

[0099] 3.4向收集管加入100 μL 液滴生成油，旋紧收集盖子，并将收集管竖直放置于固定架上。

[0100] 3.5使用移液器轻轻吹打混匀细胞，向芯片的cells(细胞)孔加入100 μL 细胞悬液，确保枪头接触孔底部；

[0101] 3.6使用移液器轻轻吹打混匀磁珠，向芯片beads(微珠)孔加入100 μL 磁珠，确保枪头接触孔底；

[0102] 3.7立即添加350 μL 液滴生成油到芯片的Oil(油)孔；

[0103] 3.8迅速将注射器的推杆拉到卡槽位置，将推杆卡在卡槽处；

[0104] 3.9液滴生成后，立即拧松收集管上的收集盖子，拔出芯片outlet孔的连接管，竖直拉伸连接管，让管中的液滴流入收集管中，剪掉收集管上的连接管；

[0105] 3.10转移液滴至八连管中，液滴液面不超过100 μL ，后在液滴表面加50–100 μL 矿物油覆盖，盖上八连管管盖后根据以下程序(表4)进行RT-PCR。

[0106] 表4:

循环数	温度	时间
1	42°C	90 min
10	50°C	2 min
	42°C	2 min

1	95°C	3 min
15	98°C	20 s
	65°C	20 s
	72°C	6 min
1	72°C	5 min
1	4°C	Hold（永久）

[0107] 注：PBMC(人外周血单核细胞)/细胞核：20cycles(循环)；细胞系：15cycles。

[0108] 4、破乳

[0109] 4.1RT(逆转录)结束后转移液滴到新低吸附的1.5mL离心管中，缓慢从底部吸，不吸最上层的矿物油，将枪头插到底部，缓慢吸取液滴生成的油弃掉，最后留下中间的乳液层。

[0110] 4.2往液滴中加入50 μ L PFO(全氟辛烷磺酸)，颠倒混匀，1000g，离心2min。

[0111] 4.3缓缓慢将水相上清(中上层)吸取到一个新的1.5mL离心管中，量取上清的体积。

[0112] 5、扩增后产物片段纯化

[0113] 5.1提前取出诺唯赞DNA纯化beads(或者Ampure XP beads)，置于室温平衡至少30min，使用前充分震荡混；

[0114] 5.2按照量取的体积计算使用的磁珠数量；

[0115] 5.3用移液器吸取0.6X诺唯赞DNA纯化beads至PCR产物中，并轻轻吹打至少10次至完全混匀，最后一次应确保将吸头中所有液体及磁珠都打入PCR管中；

[0116] 5.4室温孵育10min；

[0117] 5.5短暂离心后，将离心管置于磁力架上，静置5min，至液体澄清；

[0118] 5.6将上清吸出来到一个新的1.5ml管中，保存，待下一步纯化oligo产物。

- [0119] 5.7保持离心管置于磁力架上，加入1ml新鲜配制的80%乙醇，漂洗磁珠及管壁，静置30s，小心吸取并丢弃上清。
- [0120] 5.8重复上一步，尽量吸干管内液体，有少量残留在管壁时可将离心管瞬时离心，在磁力架上分离后，用小量程的移液器将管底液体吸干；
- [0121] 5.9保持离心管固定于磁力架上，打开管盖，室温干燥，直至磁珠表面无反光、无开裂；
- [0122] 5.10将离心管从磁力架上取下，加入48 μ l Nuclease-Free Water洗脱cDNA，用移液器轻轻吸打至少10次至完全混匀；
- [0123] 5.11室温下孵育5min；
- [0124] 5.12瞬时离心，将离心管置于磁力架上，静置2–5min至液体澄清，将46 μ l上清液转移到新的八连管中；
- [0125] 5.13取1 μ l cDNA使用Qubit dsDNA HS Kit检测浓度。
- [0126] 6、Oligo产物纯化
- [0127] 6.1在这一步留存的上清中，加入0.8X诺唯赞DNA beads，孵育5min；
- [0128] 6.2短暂离心后，将离心管置于磁力架上，静置5min，至液体澄清，弃掉上清；
- [0129] 6.3保持离心管置于磁力架上，加入1ml新鲜配制的80%乙醇，漂洗磁珠及管壁，静置30s，小心吸取并丢弃上清；
- [0130] 6.4重复上一步，尽量吸干管内液体，有少量残留在管壁时可将离心管瞬时离心，在磁力架上分离后，用小量程的移液器将管底液体吸干；
- [0131] 6.5保持离心管固定于磁力架上，打开管盖，室温干燥，直至磁珠表面无反光、无开裂；
- [0132] 6.6将离心管从磁力架上取下，加入23 μ l Nuclease-Free Water洗脱cDNA，用移液器轻轻吸打至少10次至完全混匀；
- [0133] 6.7室温下孵育5min；
- [0134] 6.8瞬时离心，将离心管置于磁力架上，静置2–5min至液体澄清，将21 μ l上清液转移到新的PCR管中，准备进行oligo文库扩增。
- [0135] 7、Oligo二次扩增

[0136] 按照表5配制cDNA扩增PCR mix。

[0137] 表5：

试剂	体积 (μl)
PCR Amp mix (PCR 反应混合物)	25
scRNA Barcode Primer (单细胞 RNA 条形码引物)	4
纯化产物	21

[0138] 将Oligo扩增PCR mix 54 μl加入上一步的cDNA纯化产物46 μl中，进行反应，反应程序设置见表6。

[0139] 表6：PCR程序

循环数	温度	时间
1	95℃	3 min
12	98℃	15 s
	60℃	30 s
	72℃	10 s
1	72℃	5 min
1	4℃	∞ (无穷)

[0140] 7、cDNA 5’ 端文库构建

[0141] 7.1按表7在冰上配制打断反应体系

[0142] 表7：

组分	单反应用量 (μL)
Smearase Buffer (片段化酶缓冲液)	10
Smearase Enzyme (片段化酶)	5
总体积	15

[0143] 7.2根据cDNA产物浓度，取100ng步骤5中纯化后的cDNA产物于新的0.2mL PCR管中，使用 NF Water补至体积到45 μL，将PCR管置于冰盒上；

[0144] 7.3用移液器吸取15 μL配制好的打断反应体系加入步骤7.2的PCR管中，涡旋振荡3次，每次3s，短暂离心将反应体系收集至管底；

[0145] 7.4当PCR仪温度降至4℃，将步骤7.2所述PCR管置于PCR仪上，跳过4℃，立即进行30℃反应(反应程序见表8)；

[0146] 表8:

温度 (°C)	时间 (min)
105 (热盖)	On (打开)
4	Hold (维持)
30	9
65	20
4	Hold

[0147] 待反应结束后，短暂离心将反应体系收集至管底，并将PCR管置于冰上。

[0148] 8、接头连接

[0149] 8.1按照表9在冰上配制接头连接反应体系；

[0150] 表9:

组分	单个反应体积 (μL)
5×Novel Ligation Buffer (新型连接酶缓冲液)	20
Novel T4 DNA Ligase (新型 T4 DNA 连接酶)	5
scRNA Adaptor (单细胞 RNA 接头)	5
NF H ₂ O (无酶水)	10
总体积	40

[0151] 8.2用移液器缓慢吸取40 μ L配制好的接头连接反应体系加入步骤7.4的PCR管中，涡旋振荡混匀，短暂离心后将反应体系收集到管底；

[0152] 8.3将步骤8.2所述PCR管置于PCR仪上，按照表10中的条件进行反应；

[0153] 表10:

温度 (°C)	时间 (min)
热盖	Off (关闭)
20	15
4	Hold

[0154] 待反应结束后，短暂离心将反应体系收集至管底；

[0155] 8.4将DNA Clean Beads提前取出，室温平衡至少30min，使用前应涡旋混匀。

[0156] 9、接头连接产物纯化及片段筛选

[0157] 9.1吸取100 μ L DNA Clean Beads至步骤8.3中的接头连接产物中，并用移液器轻轻吹吸至少10次至完全混匀，最后一次应确保将吸头中所有液体及磁珠都打入PCR管中；

- [0158] 9.2室温孵育5min;
- [0159] 9.3短暂离心后,将PCR管置于磁力架上,静置2~5min,至液体澄清,弃掉上清;
- [0160] 9.4保持PCR管在磁力架上,加入200 μ L新鲜配制的80%乙醇,漂洗磁珠及管壁,静置30s,弃掉上清;
- [0161] 9.5重复上一步,尽量吸干管内液体,有少量残留在管壁时可瞬时离心,在磁力架上分离后,用小量程的移液器将管底液体吸干;
- [0162] 9.6保持PCR管在磁力架上,打开管盖,室温干燥,直至磁珠表面无反光、无开裂;
- [0163] 9.7将PCR管从磁力架上取下,加入102 μ L NF Water,并用移液器轻轻吹吸至少10次至完全混匀;
- [0164] 9.8室温下孵育5min;
- [0165] 9.9短暂离心,将PCR管置于磁力架上,静置2~5min至液体澄清,将100 μ L上清转移到新的0.2mL PCR管中;
- [0166] 9.10吸取55 μ L DNA Clean Beads至步骤9.9的PCR管中,并用移液器轻轻吹吸至少10次至完全混匀,最后一次应确保将吸头中所有液体及磁珠都打入PCR管中;
- [0167] 9.11室温孵育5min;
- [0168] 9.12短暂离心后,将PCR管置于磁力架上,静置2~5min,至液体澄清,用移液器小心吸取上清,并转移到新的PCR管中;
- [0169] 9.13吸取15 μ L DNA Clean Beads加到上一步PCR管的上清中,并用移液器轻轻吹吸至少10次至完全混匀;
- [0170] 9.14室温孵育5min;
- [0171] 9.15短暂离心后,将PCR管置于磁力架上,静置2~5min,至液体澄清,弃掉上清;
- [0172] 9.16保持PCR管在磁力架上,加入200 μ L新鲜配制的80%乙醇,漂洗磁珠及管壁,静置30s,弃掉上清;

- [0173] 9.17重复上一步，尽量吸干管内液体，有少量残留在管壁时可瞬时离心，在磁力架上分离后，用小量程的移液器将管底液体吸干；
- [0174] 9.18保持PCR管在磁力架上，打开管盖，室温放置，直至磁珠表面无反光、无开裂。
- [0175] 9.19将PCR管从磁力架上取下，加入48 μ L NF H₂O，并用移液器轻轻吹吸至少10次至完全混匀；
- [0176] 9.20室温下孵育5min；
- [0177] 9.21短暂离心，将PCR管置于磁力架上，静置2~5min至液体澄清，将46 μ L上清转移到新的0.2mL PCR管中。
- [0178] 10、PCR扩增
- [0179] 10.1在步骤9.21的PCR管中加入4 μ L scRNA Barcode Primer；
- [0180] 10.2再向上一步反应体系中加入50 μ L PCR Amp Enzyme，涡旋振荡3次，每次3s，短暂离心将反应体系收集至管底；
- [0181] 10.3将步骤9.5.2所述PCR管置于PCR仪上，按照表11的条件进行反应；
- [0182] 表11：

温度（℃）	时间	循环数（cycle）
105（热盖）	On	
95	3 min	1
98	20 s	13
60	20 s	
72	30 s	
72	5 min	1
4	Hold	

- [0183] 11、PCR扩增产物片段筛选
- [0184] 将DNA Clean Beads提前取出，室温平衡至少30min，使用前应涡旋混匀；
- [0185] 11.1吸取55 μ L DNA Clean Beads至PCR产物中，并用移液器轻轻吹吸至少10次至完全混匀，最后一次应确保将吸头中所有液体及磁珠都打入PCR管中；
- [0186] 11.2室温孵育5min；

- [0187] 11.3短暂离心后,将PCR管置于磁力架上,静置2~5min,至液体澄清,用移液器小心吸取上清,并转移到新的PCR管中;
- [0188] 11.4吸取15 μ L DNA Clean Beads加到上一步PCR管的上清中,并用移液器轻轻吹吸至少10次至完全混匀;
- [0189] 11.5室温孵育5min;
- [0190] 11.6短暂离心后,将PCR管置于磁力架上,静置2~5min,至液体澄清,弃掉上清;
- [0191] 11.7保持PCR管在磁力架上,加入200 μ L新鲜配制的80%乙醇,漂洗磁珠及管壁,静置30s,弃掉上清;
- [0192] 11.8重复上一步,尽量吸干管内液体,有少量残留在管壁时可瞬时离心,在磁力架上分离后,用小量程的移液器将管底液体吸干;
- [0193] 11.9保持PCR管在磁力架上,打开管盖,室温放置,直至磁珠表面无反光、无开裂;
- [0194] 11.10将PCR管从磁力架上取下,加入32 μ L TE Buffer,并用移液器轻轻吹吸至少10次至完全混匀;
- [0195] 11.11室温下孵育5min;
- [0196] 11.12短暂离心,将PCR管置于磁力架上,静置2~5min至液体澄清,将30 μ L上清转移到新的1.5mL离心管中;
- [0197] 11.13取1 μ L片段筛选后的产物使用Qubit dsDNA HS Kit检测浓度。取1 μ L片段筛选后的产物使用适当的Agilent DNA分析试剂盒检测片段分布;
- [0198] QC(质检)标准:浓度大于5ng/ μ L,片段分布主峰在300~500bp之间。
- [0199] 12、变性(cDNA文库和Oligo文库)
- [0200] 12.1针对cDNA文库和Oligo文库,各取300ng至PCR管中进行后续变性和环化,不足300ng的全部投入(留够质检的量);取完样之后,各用TE Buffer补充至总体积45 μ L;
- [0201] 12.2加入5 μ L scRNA Splint Oligo到步骤12.1的PCR管中,涡旋振荡混匀,短暂离心将反应体系收集至管底;
- [0202] 12.3将步骤12.2所述PCR管置于PCR仪上,按照表12的条件进行反应;

[0203] 表12:

温度 (°C)	时间 (min)
105 (热盖)	On
95	3

[0204] 12.4 95°C反应结束后, 立即将PCR管转移到冰上, 静置5min后, 加入单链环化反应体系。

[0205] 13、单链环化

[0206] 13.1按照表13在冰上配制单链环化反应体系;

[0207] 表13:

组分	单个反应体积 (μL)
Cyclization Buffer (环化缓冲液)	9.8
DNA 连接酶	0.2
总体积	10

[0208] 13.2用移液器吸取10 μL配制好的单链环化反应体系加入步骤12.4的PCR管中, 涡旋振荡混匀, 短暂离心将反应体系收集至管底;

[0209] 13.3将步骤13.3所述PCR管置于PCR仪上, 按照表14的条件进行反应;

[0210] 表14:

温度	时间
50°C 热盖	On
37°C	30 min
4°C	Hold

[0211] 13.4反应结束后, 将PCR管短暂离心并置于冰上, 立即进入下一步反应。

[0212] 14、酶切消化

[0213] 14.1按照表15的配方在冰上配制酶切消化反应体系;

[0214] 表15:

组分	单个反应体积 (μL)
Exo 酶	2.6
Exo 缓冲液	1.4
总体积	4

[0215] 14.2用移液器吸取4 μ L配制好的酶切消化反应体系加入步骤13.4的PCR管中，涡旋振荡混匀，短暂离心将反应体系收集至管底；

[0216] 14.3将步骤14.2所述PCR管置于PCR仪上，按照表16的条件进行反应；

[0217] 表16：

温度	时间
----	----

50℃ 热盖	On
37℃	30 min
4℃	Hold

[0218] 14.4反应结束后，加入3 μ L Frag Stop Buffer，涡旋振荡混匀，短暂离心将反应体系收集至管底。

[0219] 15酶切消化产物纯化

[0220] 注：(1)将DNA Clean Beads提前取出，室温平衡至少30min，使用前应涡旋混匀；

[0221] (2)操作前请仔细阅读附录B关于磁珠及纯化。

[0222] 15.1将14.4中酶切消化产物转移至1.5mL离心管中，加入160.8 μ L DNA Clean Beads，并用移液器轻轻吹吸至少10次至完全混匀，最后一次应确保将吸头中所有液体及磁珠都打入离心管中；

[0223] 15.2室温孵育10min；

[0224] 15.3短暂离心，将离心管置于磁力架上，静置2 ~ 5min至液体澄清，弃掉上清；。

[0225] 15.4保持离心管在磁力架上，加入500 μ L新鲜配制的80%乙醇漂洗磁珠及管壁，静置30s后，弃掉上清；

- [0226] 15.5重复上一步，尽量吸干管内液体，有少量液体残留在管壁时可将离心管短暂离心，在磁力架上分离后，用小量程的移液器将管底液体吸干；
- [0227] 15.6保持离心管在磁力架上，打开管盖，室温干燥，直至磁珠表面无反光、无开裂；
- [0228] 15.7将离心管从磁力架上取下，加入32 μ L TE Buffer，并用移液器轻轻吹吸至少10次至完全混匀；
- [0229] 15.8室温下孵育10min；
- [0230] 15.9短暂离心，将离心管置于磁力架上，静置2~5min至液体澄清，将30 μ L上清转移到新的1.5mL离心管中(注意：此步骤注意不要吸到磁珠，如果吸到磁珠会对文库测序质量有很大影响)；
- [0231] 15.10取1 μ L酶切消化产物使用Qubit®ssDNA Assay Kit检测浓度。
- [0232] QC标准：浓度大于0.5ng/ μ L。
- [0233] 16、上机测序。
- [0234] 实施例2：
- [0235] 本实施例将实施例1中细胞重悬缓冲液、和微珠缓冲液中的FS组分进行调整后，进行液滴RT-PCR高通量单细胞转录组测序，其余实验条件及步骤同实施例1。
- [0236] 调整后的5X FS组分配制：125mM Tris-HCl，250mM KCl，25mM MgCl₂。
- [0237] 对比例1：
- [0238] 本实施例采用现有技术中细胞重悬缓冲液、和微珠缓冲液中的FS组分进行液滴RT-PCR高通量单细胞转录组测序，其余实验条件及步骤同实施例1。
- [0239] 现有技术中5X FS组分：250mM Tris-HCl，375mM NaCl，15mM MgCl₂。
- [0240] 实施例3：结果对比分析
- [0241] 实施例1与对比例1表示通过不同离子浓度的FS组分，主要探究不同离子浓度对RT-PCR体系以及单细胞转录组测序结果的影响。
- [0242] 实施例1和实施例2表示通过使用不同FS组分，探究K⁺和Na⁺以及酶浓度对RT-PCR体系以及单细胞转录组测序结果的影响。

[0243] 其中，经过实验验证，离子浓度、RT酶的浓度对RT-PCR体系影响结果如表17所示；

[0244] 表17：

组别	PCR 后浓度	0.6X 纯化后
R1-3	90.4	19.7
R1-4	90.4	22.6
R2-3	76.8	33.6
R2-4	76.8	27.2
R3-3	15.1	0.712
R3-4	15.1	0.950
R4-3	13.1	1.19
R4-4	13.1	1.31

[0245] 注：R1-3和R1-4为一组重复实验；R2-3和R2-4为一组重复实验；R3-3和R3-4为一组重复实验；R4-3和R4-4为一组重复实验；

[0246] R1：实施例1所述5X FS和2.5 μ L 420RT酶(LS-EZ-E-00027P，BGI)；

[0247] R2：实施例1所述5X FS和1 μ L 420RT酶(LS-EZ-E-00027P，BGI)；

[0248] R3：对比例1所述5X FS和2.5 μ L 420RT酶(LS-EZ-E-00027P，BGI)；

[0249] R4：对比例1所述5X FS和1 μ L 420RT酶(LS-EZ-E-00027P，BGI)。

[0250] 结果表明，R1与R2、R3与R4的对比，表明酶的浓度影响差异不大；R1与R3、R2与R4的对比，表明盐离子浓度对RT-PCR体系影响很大。R1和R3对比，不仅R1cDNA纯化后的浓度显著高于R3；同理R2高于R4，且从cDNA峰图(图11)也看出R1结果比R3好；同理R2比R4好。

[0251] 基于上述结果，验证离子浓度对单细胞转录组测序的影响；

[0252] 经过实验验证，不同离子组分(K⁺和Na⁺)对单细胞转录组测序影响的比较结果如表18所示；

[0253] 表18：

	映射%	外显子%	细胞数	UMI	基因	测序读段/细胞
1-1 (Na ⁺)	95.64%	76.90%	12000	4488	1469	13422
1-2 (Na ⁺)	96.86%	82.20%	12000	5305	1553	19394
2-1 (K ⁺)	96.31%	85.50%	12000	6122	1311	18152
2-2 (K ⁺)	95.19%	84.30%	12000	6722	1701	25610

[0254] 注：1-1和1-2表示样本的两次重复实验；2-1和2-2表示样本的两次重复实验。

[0255] 其中，图1~4为测序质检报告结果，可以看出，不同离子组分(K^+ 和 Na^+)对单细胞转录组测序结果影响较小，其中， K^+ 组中UMI数量高于 Na^+ 组。图5~7为不同离子组分获得的PCR扩增产物2100片段分布图，可以看出， K^+ 组的扩增产物片段分布更好，表现为获得更长的片段且主峰在800–1800bp。

[0256] 综上所述，基于上述实验验证结果可以得出，mapping(映射)率，外显子比对率以及UMI和基因数均能得到较优的效果，表明上述方案在单细胞转录组高通量测序具有广泛的应用前景。

[0257] 此外，术语“第一”、“第二”仅用于描述目的，而不能理解为指示或暗示相对重要性或者隐含指明所指示的技术特征的数量。由此，限定有“第一”、“第二”的特征可以明示或者隐含地包括至少一个该特征。在本发明的描述中，“多个”的含义是至少两个，例如两个，三个等，除非另有明确具体的限定。

[0258] 在本说明书的描述中，参考术语“一个实施例”、“一些实施例”、“示例”、“具体示例”、或“一些示例”等的描述意指结合该实施例或示例描述的具体特征、结构、材料或者特点包含于本发明的至少一个实施例或示例中。在本说明书中，对上述术语的示意性表述不必须针对的是相同的实施例或示例。而且，描述的具体特征、结构、材料或者特点可以在任一个或多个实施例或示例中以合适的方式结合。此外，在不相互矛盾的情况下，本领域的技术人员可以将本说明书中描述的不同实施例或示例以及不同实施例或示例的特征进行结合和组合。

[0259] 尽管上面已经示出和描述了本发明的实施例，可以理解的是，上述实施例是示例性的，不能理解为对本发明的限制，本领域的普通技术人员在本发明的范围内可以对上述实施例进行变化、修改、替换和变型。

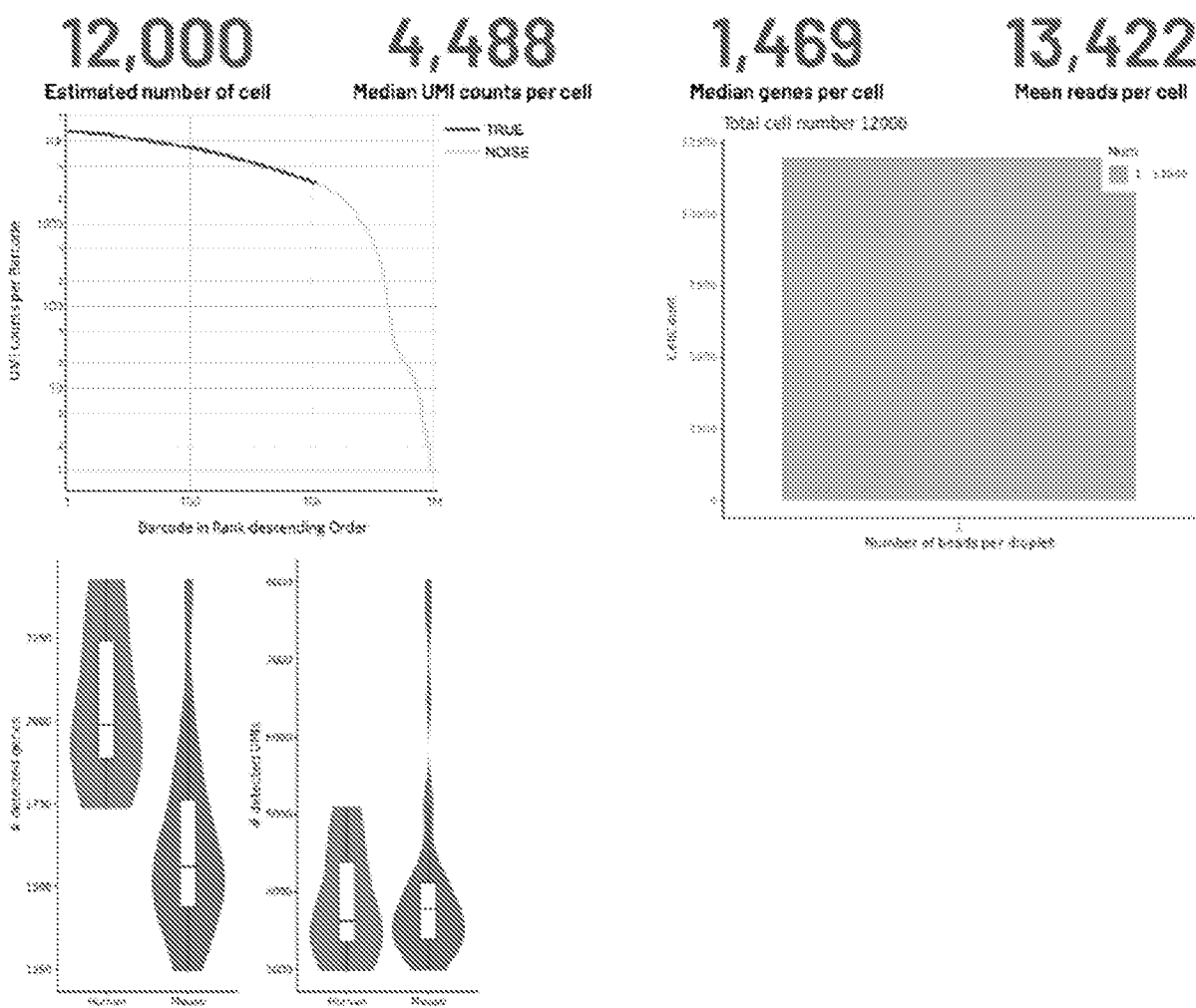
权利要求书

- [权利要求 1] 一种基于液滴的PCR扩增方法，其特征在于，包括：
将待测样本单细胞进行油滴包裹处理，以便获得待测样本单细胞油滴；以及
将所述油滴内的待测样本单细胞进行PCR扩增处理；
其中，所述待测样本单细胞是以细胞悬液的形式提供的，所述细胞悬液包括所述待测样本单细胞和第一缓冲液，所述第一缓冲液包括FS，所述FS包括Tris-HCl、NaCl和MgCl₂。
- [权利要求 2] 根据权利要求1所述的方法，其特征在于，所述Tris-HCl在所述第一缓冲液中的浓度为20 ~ 30mM，优选25mM；
所述NaCl在所述第一缓冲液中的浓度为25 ~ 75mM，优选50mM；
所述MgCl₂在所述第一缓冲液中的浓度为3 ~ 8mM，优选5mM。
- [权利要求 3] 根据权利要求1所述的方法，其特征在于，所述第一缓冲液进一步包括甜菜碱、dNTP、dCTP、三羟丙基膦、核酸酶抑制剂、S2引物和KAPA高保真DNA聚合酶。
- [权利要求 4] 根据权利要求3所述的方法，其特征在于，所述甜菜碱在第一缓冲液中的终浓度为0.5 ~ 2M，优选1M。
- [权利要求 5] 根据权利要求3所述的方法，其特征在于，所述dNTP在第一缓冲液中的终浓度为0.2 ~ 2mM，优选1mM。
- [权利要求 6] 根据权利要求3所述的方法，其特征在于，所述dCTP在第一缓冲液中的终浓度为1 ~ 5mM，优选5mM。
- [权利要求 7] 根据权利要求3所述的方法，其特征在于，所述KAPA高保真DNA聚合酶在第一缓冲液中的终浓度为0.01 ~ 0.03U/μL；优选0.02U/μL。
- [权利要求 8] 根据权利要求3所述的方法，其特征在于，所述三羟丙基膦在第一缓冲液中的终浓度为0.01 ~ 0.03M，优选0.01M。
- [权利要求 9] 根据权利要求3所述的方法，其特征在于，所述核酸酶抑制剂在第一缓冲液中的终浓度为1 ~ 3U/μL，优选1U/μL。

- [权利要求 10] 根据权利要求3所述的方法，其特征在于，所述S2引物在第一缓冲液中的终浓度为 $0.6 \sim 1.2 \mu\text{M}$ ，优选 $0.9 \mu\text{M}$ 。
- [权利要求 11] 根据权利要求3所述的方法，其特征在于，所述第一缓冲液进一步包括：SSIV逆转录酶；所述SSIV逆转录酶在第一缓冲液中的终浓度为 $3 \sim 5\text{U}/\mu\text{L}$ ，优选 $4.5\text{U}/\mu\text{L}$ 。
- [权利要求 12] 根据权利要求3所述的方法，其特征在于，所述第一缓冲液进一步包括：二硫苏糖醇；所述二硫苏糖醇在第一缓冲液中的终浓度为 $0.01 \sim 0.03\text{M}$ ，优选 0.01M 。
- [权利要求 13] 根据权利要求3所述的方法，其特征在于，所述第一缓冲液进一步包括：Poly dT；所述Poly dT在第一缓冲液中的终浓度为 $1 \sim 4 \mu\text{M}$ ，优选 $2.5 \mu\text{M}$ 。
- [权利要求 14] 根据权利要求1所述的方法，其特征在于，所述油滴包裹处理是通过如下方式进行的：
将待测样本单细胞悬液、微珠悬液以及液滴形成油进行混合处理。
- [权利要求 15] 根据权利要求14所述的方法，其特征在于，所述微珠悬液包括微珠和第二缓冲液，所述第二缓冲液包括FS，所述FS包括Tris-HCl、NaCl和 MgCl_2 。
- [权利要求 16] 根据权利要求15所述的方法，其特征在于，所述Tris-HCl在所述第一缓冲液中的浓度为 $20 \sim 30\text{mM}$ ，优选 25mM ；
所述NaCl在所述第一缓冲液中的浓度为 $40 \sim 60\text{mM}$ ，优选 50mM ；
所述 MgCl_2 在所述第一缓冲液中的浓度为 $3 \sim 8\text{mM}$ ，优选 5mM 。
- [权利要求 17] 根据权利要求15所述的方法，其特征在于，所述第二缓冲液进一步包括：曲拉通X-100、洋地黄皂苷和ficoll。
- [权利要求 18] 根据权利要求17所述的方法，其特征在于，所述曲拉通X-100在所述第二缓冲液中的浓度为 $0.1 \sim 0.3\%(\text{w/v})$ ，优选 $0.1\%(\text{w/v})$ 。
- [权利要求 19] 根据权利要求17所述的方法，其特征在于，所述洋地黄皂苷在所述第二缓冲液中 $0.01 \sim 0.03\%(\text{w/v})$ ，优选 $0.025\%(\text{w/v})$ 。

- [权利要求 20] 根据权利要求17所述的方法，其特征在于，所述ficoll在所述第二缓冲液中的终浓度为2~10% (w/v)，优选4% (w/v)。
- [权利要求 21] 一种测序文库构建方法，其特征在于，包括：
基于权利要求1-20任一项所述的方法对待测样本进行PCR扩增反应，以便获得扩增产物，所述扩增产物构成所述测序文库。
- [权利要求 22] 根据权利要求21所述的方法，其特征在于，进一步包括将所述扩增产物进行破乳处理和片段化处理；以及
将片段化处理产物与测序接头进行连接处理。
- [权利要求 23] 根据权利要求22所述的方法，其特征在于，所述破乳处理是通过如下步骤进行的：
将扩增产物与表面活性剂进行混合处理，以便获得破乳处理产物。
- [权利要求 24] 根据权利要求22所述的方法，其特征在于，所述片段化处理是在片段化酶存在条件下进行的。
- [权利要求 25] 一种测序文库，其特征在于，所述测序文库是通过权利要求21-24任一项所述的方法获得的。
- [权利要求 26] 一种对目标核酸分子进行测序的方法，其特征在于，包括：
针对目标序列，根据权利要求21-24任一项所述的方法，构建测序文库；
针对所述测序文库进行测序，以便获得测序结果；和
基于所述测序结果，确定所述目标核酸分子的核酸序列。
- [权利要求 27] 一种液滴PCR扩增试剂盒，其特征在于，包括：
权利要求1-13任一项所述方法中限定的第一缓冲液；
权利要求1或15-20任一项所述方法中限定的第二缓冲液；和
液滴生成油。
- [权利要求 28] 根据权利要求27所述的试剂盒，其特征在于，进一步包括：消化酶。

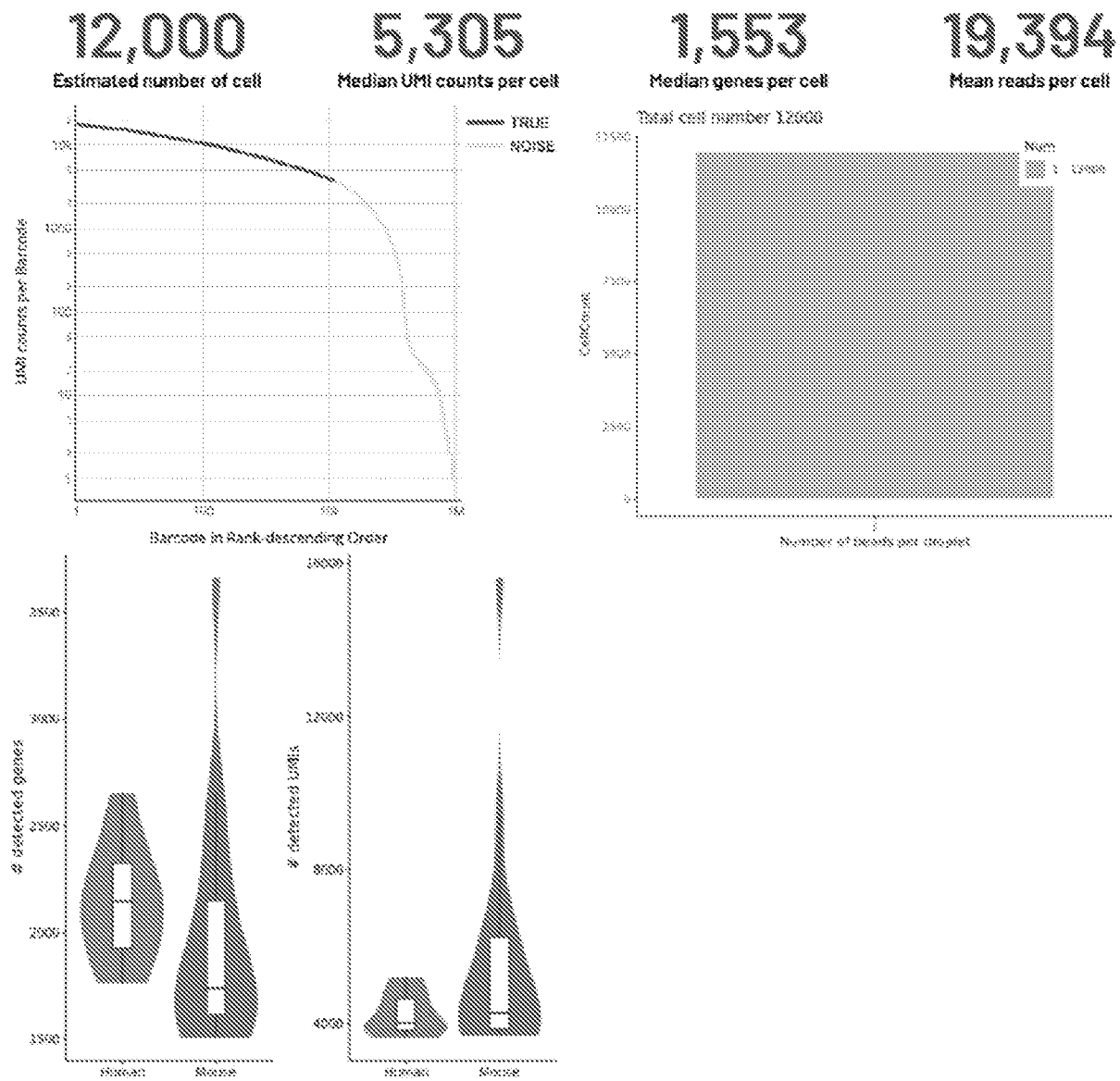
[图 1]



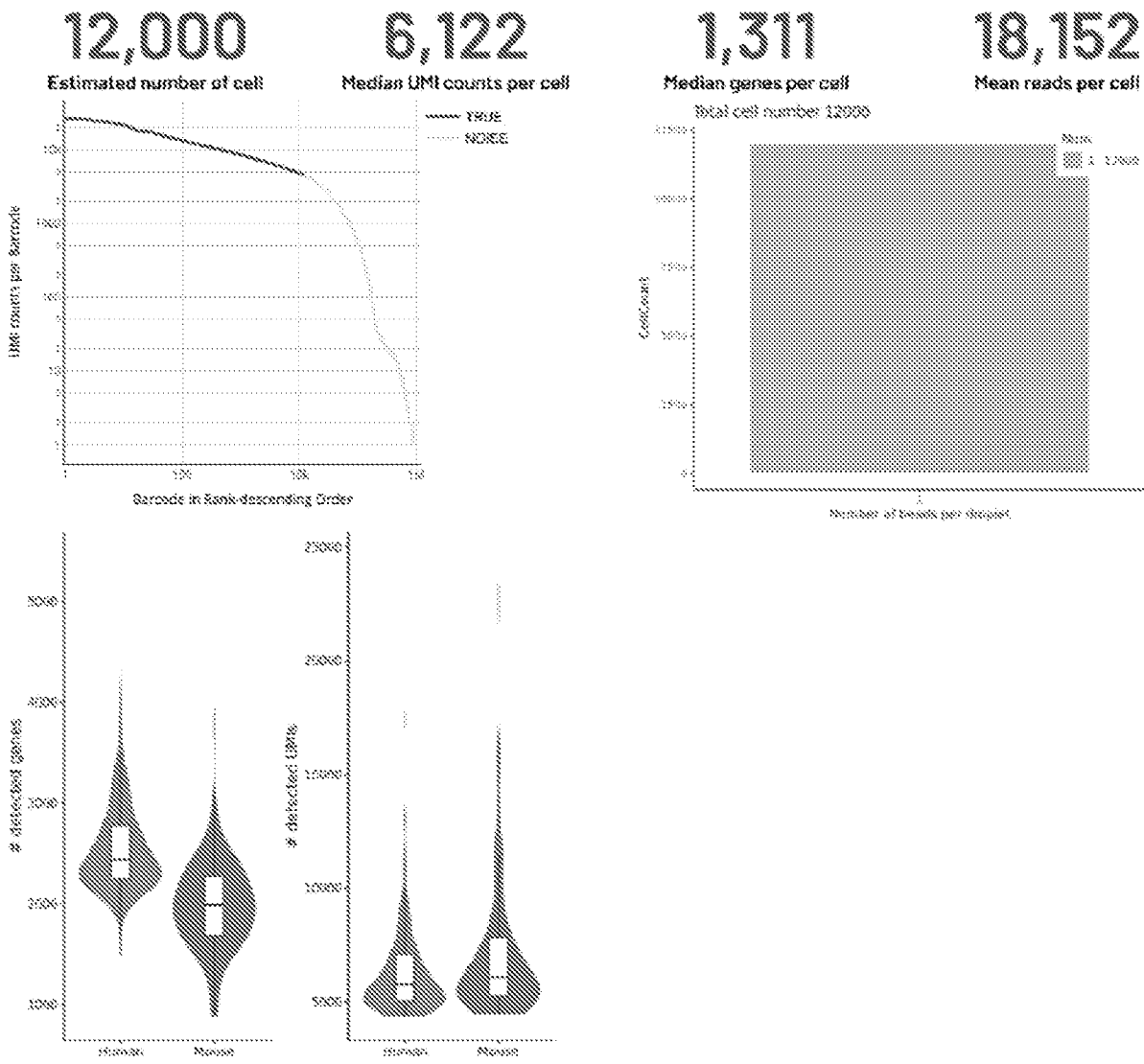
细则 26,
08.01.2024

[图 2]

细则 26,
08.01.2024



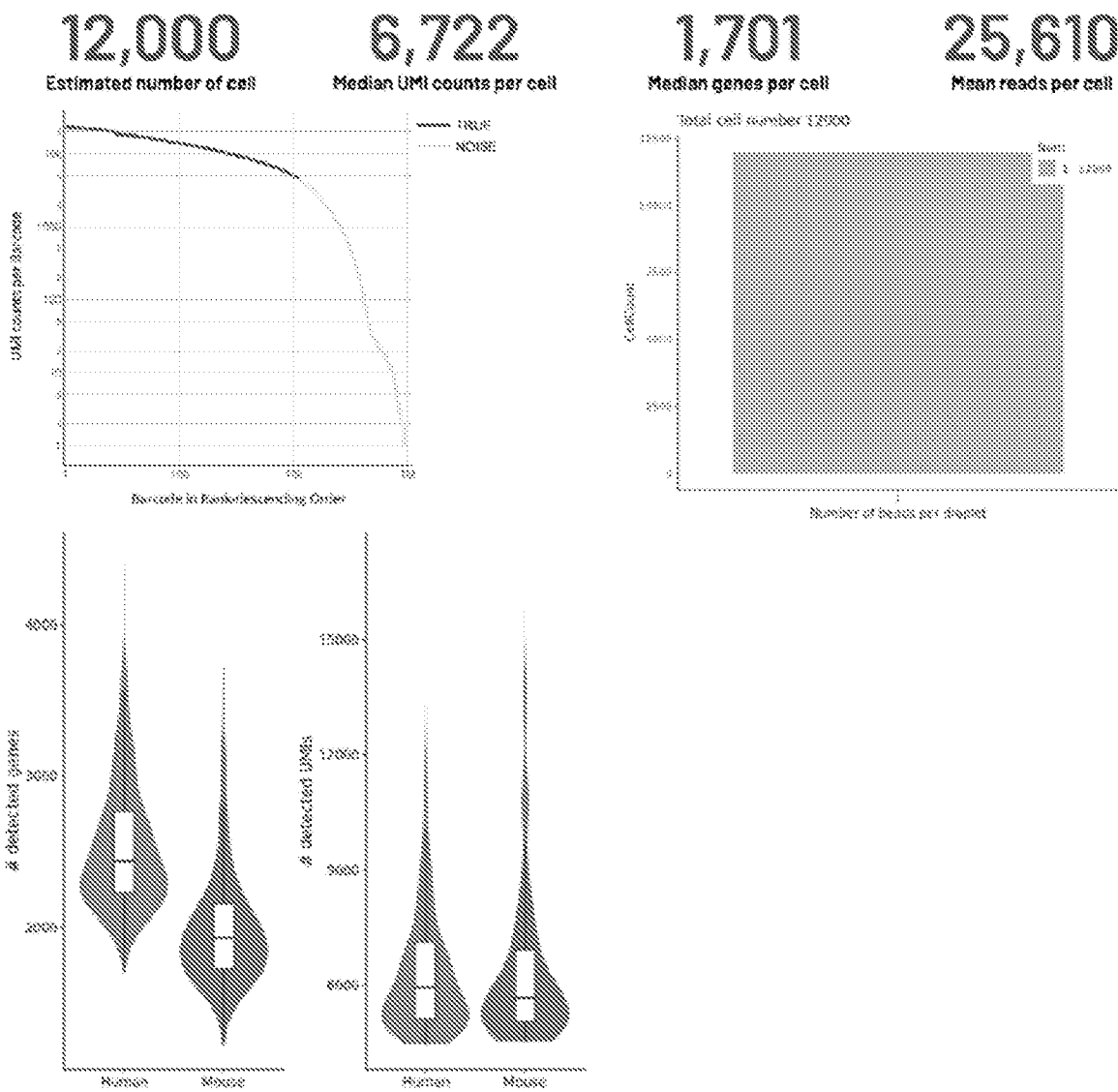
[图 3]



细则 26,
08.01.2024

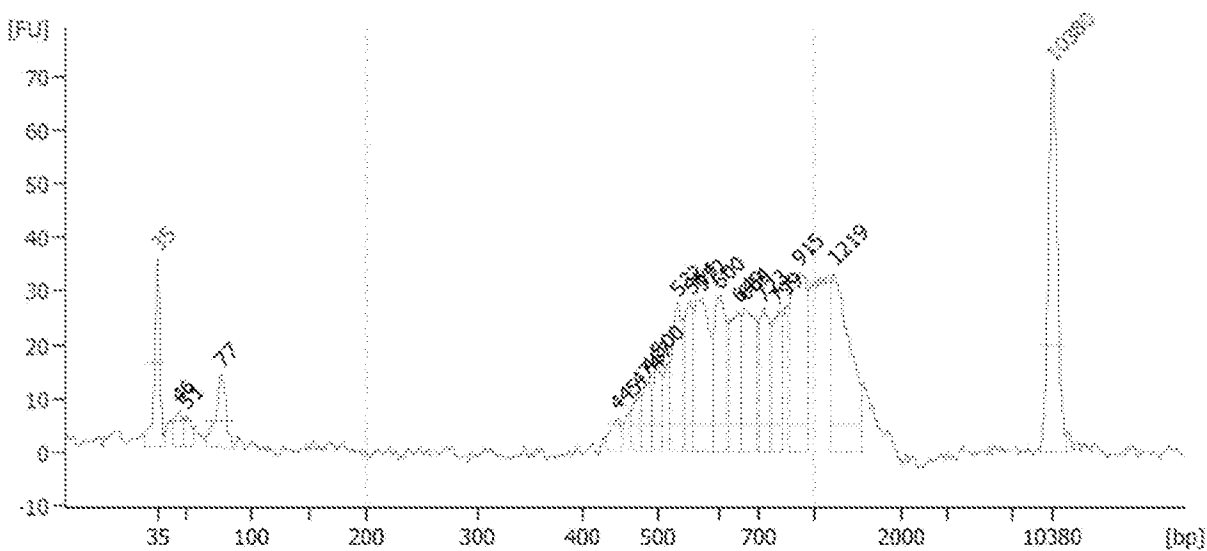
[图 4]

细则 26,
08.01.2024

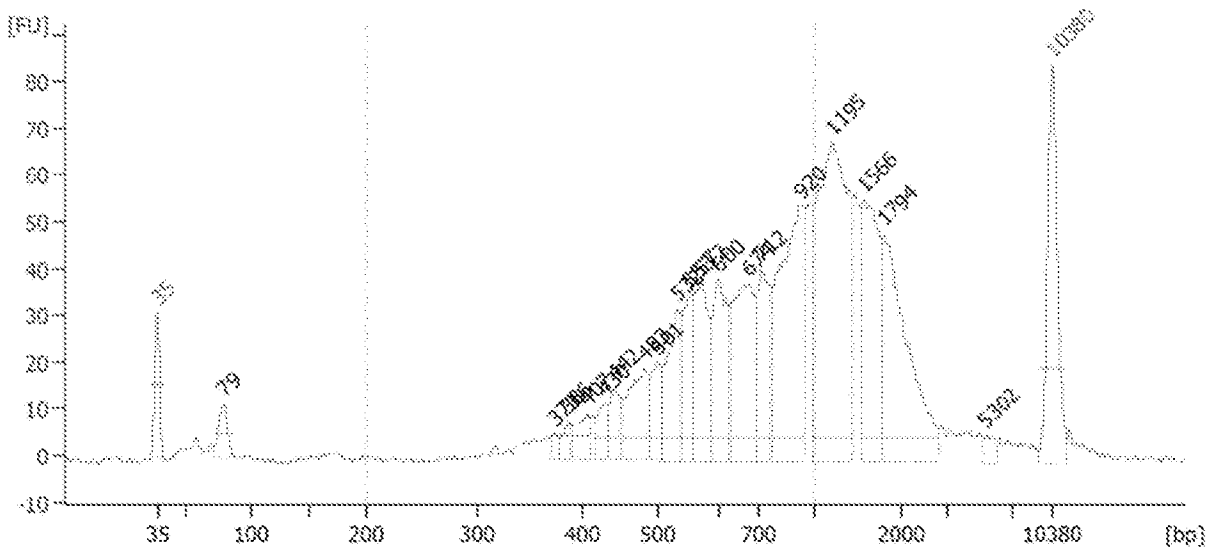


[图 5]

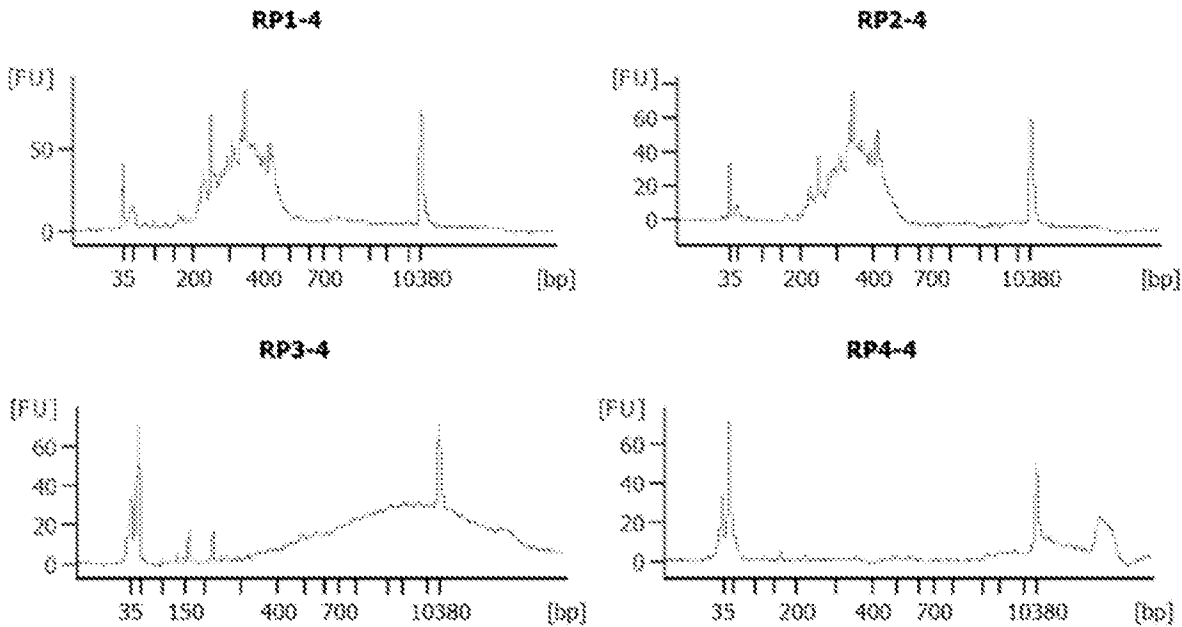
细则 26,
08.01.2024



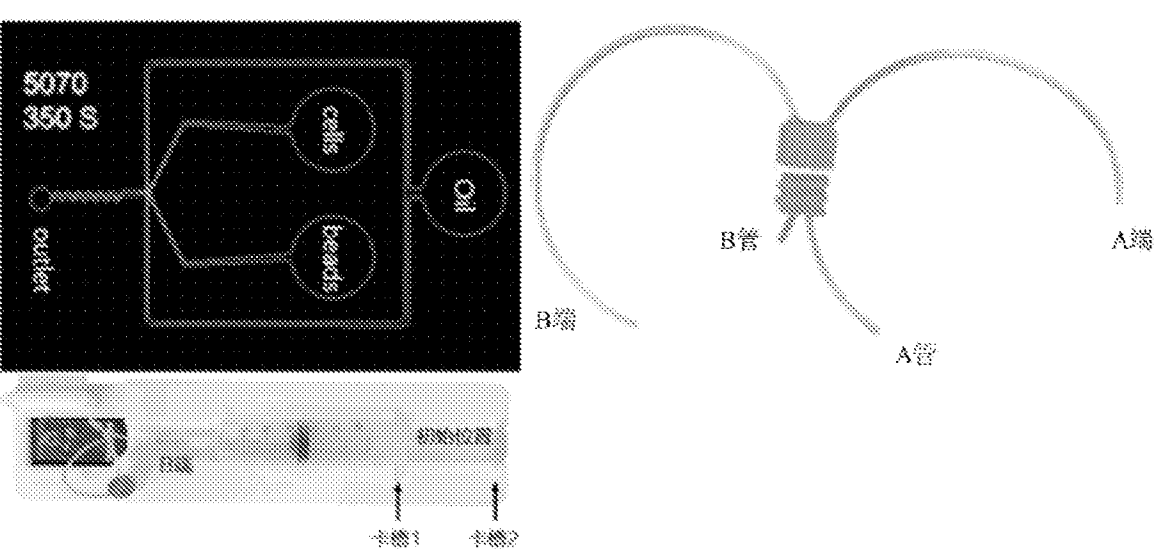
[图 6]



[图 7]



[图 8]



细则 26,
08.01.2024

细则 26,
08.01.2024

细则 26,
08.01.2024

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2023/139573

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12Q1/6869(2018.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC: C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNXTX, WPABSC, WPABS, ENTXTC, ENTXT, DPWI, VEN, CNKI, Web of Science, BING, 百度学术, BAIDU SCHOLAR, incoPat: 申请人, 发明人, 油滴, oil drop, 单细胞, single cell, 测序, sequencing, Tris HCl, 三羟甲基氨基甲烷, 氯化钠, NaCl, 氯化镁, MgCl₂, 甜菜碱, 三甲基甘氨酸, betaine, trimethylglycine, 三羟丙基膦, THPP, trihydroxypropyl phosphine, 二硫苏糖醇, DTT, dithiothreitol, 洋地黄皂苷, digitonin, ficoll

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 115181790 A (BGI TECH SOLUTIONS CO., LTD.) 14 October 2022 (2022-10-14) description, paragraphs 9-21 and 59-134	1-2, 14-16, 21, 25-27
Y	CN 115181790 A (BGI TECH SOLUTIONS CO., LTD.) 14 October 2022 (2022-10-14) description, paragraphs 9-21 and 59-134	3-13, 17-28
Y	CN 115873922 A (MGI TECH CO., LTD.) 31 March 2023 (2023-03-31) description, paragraphs 11-31 and 63-93	3-13, 21-28
Y	CN 116507737 A (QIAGEN GMBH) 28 July 2023 (2023-07-28) claims 1-22, and description, paragraph 12	8, 21-28
Y	CN 115537408 A (XIAMEN UNIVERSITY) 30 December 2022 (2022-12-30) description, paragraphs 15-24 and 182-187	17-28
A	WO 2023150708 A1 (BECTON, DICKINSON AND COMPANY) 10 August 2023 (2023-08-10) claims 1, 8, 25-26, 35, and 84-85, and description, paragraphs 20-28, 67, and 191-194	1-28



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

“D” document cited by the applicant in the international application

“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date

“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

16 August 2024

Date of mailing of the international search report

11 September 2024

Name and mailing address of the ISA/CN

China National Intellectual Property Administration (ISA/
CN)

China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District,
Beijing 100088

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2023/139573

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	黄韵怡 (HUANG, Yunyi). "用于单细胞RNA测序的细胞—微珠捕获微流控技术的开发 (Development of Cell-Beadcapture Microfluidics For single-Cell Rnasequencing)" 中国优秀硕士学位论文全文数据库 基础科学辑 (Basic Sciences, China Master's Theses Full-Text Database), No. 2, 15 February 2023 (2023-02-15), no. A006-129 abstract	1-28
A	ZHOU, Wenmin et al. "Microfluidics Applications for High-Throughput Single Cell Sequencing" Journal of Nanobiotechnology, Vol. 19, 11 October 2021 (2021-10-11), no. 312 abstract	1-28

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2023/139573

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	115181790	A	14 October 2022	None			
CN	115873922	A	31 March 2023	None			
CN	116507737	A	28 July 2023	EP	4225935	A1	16 August 2023
				US	2023357824	A1	09 November 2023
				AU	2021357742	A1	04 May 2023
				US	2023357823	A1	09 November 2023
				AU	2021356108	A1	04 May 2023
				AU	2021356108	A9	18 April 2024
				JP	2023544132	A	20 October 2023
				WO	2022074089	A1	14 April 2022
				WO	2022074087	A1	14 April 2022
				JP	2023543269	A	13 October 2023
				EP	4225932	A1	16 August 2023
CN	115537408	A	30 December 2022	None			
WO	2023150708	A1	10 August 2023	None			

A. 主题的分类

C12Q1/6869(2018.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

IPC: C12Q

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

CNTEXT, WPABSC, WPABS, ENTXTC, ENTXT, DPWI, VEN, CNKI, Web of Science, BING, 百度学术, incoPat: 申请人, 发明人, 油滴, oil drop, 单细胞, single cell, 测序, sequencing, Tris HCl, 三羟甲基氨基甲烷, 氯化钠, NaCl, 氯化镁, MgCl2, 甜菜碱, 三甲基甘氨酸, betaine, trimethylglycine, 三羟丙基膦, THPP, trihydroxypropyl phosphine, 二硫苏糖醇, DTT, dithiothreitol, 洋地黄皂苷, digtonin, ficoll

C. 相关文件

类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
X	CN 115181790 A (深圳华大基因科技服务有限公司) 2022年10月14日 (2022 - 10 - 14) 说明书第9-21、59-134段	1-2,14-16,21,25-27
Y	CN 115181790 A (深圳华大基因科技服务有限公司) 2022年10月14日 (2022 - 10 - 14) 说明书第9-21、59-134段	3-13,17-28
Y	CN 115873922 A (深圳华大智造科技股份有限公司) 2023年3月31日 (2023 - 03 - 31) 说明书第11-31、63-93段	3-13,21-28
Y	CN 116507737 A (恰根有限公司) 2023年7月28日 (2023 - 07 - 28) 权利要求1-22, 说明书第12段	8,21-28
Y	CN 115537408 A (厦门大学) 2022年12月30日 (2022 - 12 - 30) 说明书第15-24、182-187段	17-28
A	WO 2023150708 A1 (BECTON, DICKINSON AND COMPANY) 2023年8月10日 (2023 - 08 - 10) 权利要求1、8、25-26、35、84-85, 说明书第20-28、67、191-194段	1-28

☒ 其余文件在C栏的续页中列出。

☒ 见同族专利附件。

★ 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“D” 申请人在国际申请中引证的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

2024年8月16日

国际检索报告邮寄日期

2024年9月11日

ISA/CN的名称和邮寄地址

中国国家知识产权局
中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088

授权官员

冯晓亮

电话号码 (+86) 010-53961927

PCT/ISA/210 表(第2页) (2022年7月)

C. 相关文件		
类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
A	黄韵怡. "用于单细胞RNA测序的细胞—微珠捕获微流控技术的开发" 中国优秀硕士学位论文全文数据库基础科学辑, 第2期, 2023年2月15日 (2023 - 02 - 15), 编号A006-129 摘要	1-28
A	ZHOU, W.M.等. "Microfluidics applications for high-throughput single cell sequencing" JOURNAL OF NANOBIO TECHNOLOGY, 第19卷, 2021年10月11日 (2021 - 10 - 11), 编号312 摘要	1-28

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2023/139573

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	115181790	A	2022年10月14日	无			
CN	115873922	A	2023年3月31日	无			
CN	116507737	A	2023年7月28日	EP	4225935	A1	2023年8月16日
				US	2023357824	A1	2023年11月9日
				AU	2021357742	A1	2023年5月4日
				US	2023357823	A1	2023年11月9日
				AU	2021356108	A1	2023年5月4日
				AU	2021356108	A9	2024年4月18日
				JP	2023544132	A	2023年10月20日
				WO	2022074089	A1	2022年4月14日
				WO	2022074087	A1	2022年4月14日
				JP	2023543269	A	2023年10月13日
				EP	4225932	A1	2023年8月16日
CN	115537408	A	2022年12月30日	无			
WO	2023150708	A1	2023年8月10日	无			