**Smart-RNA-seq实验步骤**

* 单细胞裂解，裂解液配制如下（最多冻融2次）

|  |  |
| --- | --- |
| **组分（/管）** | **体积(μl)** |
| **RNase Inhibitor(40U/μl)** | 0.05 |
| **10% Triton X-100（自配）** | 0.095 |
| **Nuclease-free water** | 1.805 |
| **dNTP(10 mM)** | 0.5 |
| **barcode(10 uM)** | 0.1 |
| **总体积** | 2.55 |

按照不同barcode配置上述裂解液，标注好2.55μl/管分装到八连管中（该步骤可以-80℃暂存）。

* （冻存裂解液提前冰浴融解）流式分选或镜下挑取单个细胞到每管中（该步骤可以-80℃暂存）。

**①流式分选：将八连管放置于分选专用96孔板中，精确调整好位置后进行单细胞分选。**

单细胞分选前先调整Drop，速度在1500-3000 events才可以auto delay。Drop调整好后（分选效率＞95%），用阴性管圈门，调整位置，一般每次调整4排八连管固定位置，保证液滴位置在八连管正中间（可以稍偏左但不能偏右，因为液流打出方向是从右向左）。如果调整位置home后还是微斜，则继续微调四路中最左侧电压数值（34-36）。调整完一排后要四排一起看，位置都正后再分选。

**②镜下挑取：将余下MkP分选到StemSpan+TPO+SCF+IL-3培基中培养3-5天，镜下吸取单细胞。**将细胞重悬于0.1%BSA（in DPBS），调整适当细胞密度于6孔板中用2.5μl移液枪镜下吸取单个细胞（0.5μl），暂存于-80℃。

* 提前从-80℃冰箱取出包含目的细胞的裂解液放置于冰板上，剧烈涡旋震荡50s，瞬离后置于PCR仪中72°C孵育3分钟，之后迅速转移至冰上。

**本次实验（2019-4-28；HD-MkP常云馨）1-16未提前72℃预孵育；17-24正常操作。**

* 逆转录，反应体系配制如下（提前配置，**不需富余量**）：

|  |  |
| --- | --- |
| **组分** | **体积(μl)** |
| **SuperScript II reverse transcriptase(200 U/μl)** | 0.25 |
| **RNAse inhibitor(40 U/μl)** | 0.125 |
| **Superscript II first-strand buffer(5x)** | 1 |
| **0.1M DTT** | 0.25 |
| **Betaine (5M) （自配） 借** | 1 |
| **MgCl2 (1M) 借** | 0.03 |
| **TSO(100uM)** | 0.05 |
| **Nuclease-free water** | 0.145 |
| **总体积** | 2.85 |

1）用排枪加入2.85μl混合液至管壁上（**只打第一档，~2.5μl/tube，防气泡**），离心，轻轻涡旋混匀（不吹打），再次离心，**确认管盖全部盖紧**。

2）置PCR仪中，反应设置如下（~1小时50分钟取出）：

25°C 5min; 42°C 60min; 50°C 30 min; 72°C 10mn; 4°C forever。

* PCR扩增（提前配置，**每10孔多1个富余量**）：

|  |  |
| --- | --- |
| **组分** | **体积(μl)** |
| **KAPA HiFi HotStart ReadyMix (2x)** | 6.25 |
| **IS PCR primers(10uM)** | 0.125 |
| **3’P2 (10uM)** | 0.625 |
| **Nuclease-free water** | 0.5 |
| **Total volume** | 7.5 |

1）加入7.5μl混合液至管壁上，轻轻涡旋混匀，离心，确认管盖全部盖紧。

2）置PCR仪中，反应设置如下：

① 95°C 3min；②4个循环：98°C 20s，65°C for 30s，72°C 5min；③**14**个循环（10-16）：98°C 20s，67°C 15s，72°C 5min；④72°C 5min，4°C forever。

3）随机取2管Qbit测浓度（参考浓度10-16ng/ul，浓度低提高循环数，浓度高降低循环数）。

4）若~50个细胞混合每管各取6μl产物，若94个细胞混合每管各取3μl产物，**总量~3μg**混合至一新的EP管中，进行后续纯化。

**本次实验（2019-4-28；HD-MkP常云馨）**1号扩增后浓度21.6ng/μl；9号扩增后浓度16.7ng/μl；1号扩增后浓度14.4ng/μl.。**1-16号各6.5μl混合；17-24号各6.5μl混合。**

* 纯化

1. 使用（Zymo）DNA clean&Collection Kit对DNA进行纯化，用50μl水洗脱（抽测，参考浓度10ng/ul）。

将混合的PCR扩增产物转移到1.5mlEP管内，按照1:5加入DNA Binding Buffer。

混匀后转移至Zymo-Spin™ Column中，放置到收集管上。10000×g离心30s，弃废液。

加入200μl DNA Washing Buffer，10000×g离心30s，弃废液。

重复洗涤一次。10000×g离心30s空离，弃废液。

将Zymo-Spin™ Column转移到干净的离心管上，加入50μl水室温孵育2-5分钟，然后以最快速度离心30s，收集纯化产物。

2) 使用0.8x XP磁珠纯化DNA两次，用21μl水洗脱，Qubit DNA(HS) 测定浓度（参考浓度1.5-2.5ng/ul）。

每50μl DNA纯化液加入40μl XP磁珠**（10:8，4℃保存，提前取出，室温避光平衡30min）**，于PCR管内涡旋混合，瞬离后避光静置10min。

将PCR管放置于磁力架上静置5min，小心吸弃上清。

取下PCR管，每管加入200μl 80%乙醇（现配现用）重悬磁珠，静置1min后放置于磁力架上静置3min，小心吸弃上清。重复洗涤一次。

加入50μl水重悬磁珠，静置5min后放置于磁力架上静置3min，小心收集上清于新的PCR管，重复上述纯化过程（依次完成0.8xXP磁珠富集，80%乙醇洗涤）。

加入22μl水重悬磁珠，静置5min后放置于磁力架上静置3min，小心收集上清于新的PCR管。

取1μl 洗脱产物Qubit DNA（HS）测浓度。余下21μl 洗脱产物用于Biotin-PCR扩增。

* 生物素引物PCR

1）取**40ng DNA**作为模板，反应体系如下：

|  |  |
| --- | --- |
| **组分** | **体积(μl)** |
| **KAPA HiFi HotStart ReadyMix (2x)** | 25 |
| **IS PCR primer(10uM)** | 2 |
| **Biotin index primer (10uM)** | 2 |
| **Nuclease-free water (**含模板DNA**)** | 21 |
| **总体积** | 50 |

2）置于PCR仪中，反应设置如下：① 95°C 3min；② 4 个循环**（本次实验模板量少，设置成5个循环）**：98°C 20s，67°C 15s，72°C 5min；③ 72°C 5min，4°C 保持。

3）使用40μl（0.8x）XP磁珠进行纯化，用132μl Elution buffer洗脱。

每50μl DNA纯化液加入40μl XP磁珠，于PCR管内涡旋混合，瞬离后避光静置10min。

将PCR管放置于磁力架上静置5min，小心吸弃上清。

取下PCR管，每管加入200μl 80%乙醇（现配现用）重悬磁珠，静置1min后放置于磁力架上静置3min，小心吸弃上清。重复洗涤一次。

加入132μl Elution buffer重悬磁珠，静置5min后放置于磁力架上静置3min，小心收集上清于新的PCR管。

可取1μl 洗脱产物Qubit DNA（HS）抽测浓度（浓度范围为2-4ng/ul）。余下洗脱产物用于DNA片段化。

* DNA片段化

1. 取约300ng DNA，设定Covaris DNA300程序进行打断。

直接将130μl DNA悬液，缓慢打入打断管内，不要有气泡。

超声打断仪器**（华苑）**使用：**可提前让华苑老师或同学开机！**

取~2L ddH2O加入打断仪下面水槽内至左侧刻度线15，放下超声头水位升至右侧刻度线15；依次打开稳压器、上层降温仪器（长按**△**至OFF变为温度）、超声打断仪和电脑，登录账号liucuicui + 密码AZ123456；至降温仪器温度降至4℃，电脑显示Water too hot变为绿对号√，点击Degas Pump开始拍气泡，至所有指数全变为绿对号√；选择程序DNA 300 BP 80s（默认程序），取下放样头，将打断管放入底部卡住，点击RUN。程序运行结束后，将水槽内水倒光，再次点击Degas Pump拍气泡，之后将仪器以及水槽擦拭干净，依次关闭超声打断仪、上层降温仪器、稳压器和电脑。

2）使用zymo试剂盒对DNA进行纯化，用50μl水洗脱。**（纯化方法同上）**

3）使用50μl 1x XP磁珠（1：1）纯化DNA一次，用50μl水洗脱（抽测，参考浓度2-4ng/ul）。**（洗脱方法同上）**

* DNA生物素富集

1）每个样本使用10μl C1磁珠，加入200μl 2X B&W溶液，放置于磁铁架上清洗磁珠一次（去上清）。

2）加入50μl 2X B&W溶液重悬磁珠，对应加入50μl DNA片段中吹匀，并用胶布将样本固定于旋转器背面，室温旋转(20-30rpm/min) 孵育45分钟。

4）孵育后置于磁力架上，弃去上清。

5）加入100μl 1x B&W溶液清洗磁珠后，加入100μl Elution buffer再次清洗。

6）25μl H2O重悬磁珠直接进行后续建库。

**2X B&W溶液配方（总体积50ml）：**

**1M Tris-HCL（pH7.5） 500μl；500mM EDTA 100μl；5M NaCl 20ml（过滤后使用）；20% Tween-20 12.5μl；H2O 29.275ml**

**使用KAPA试剂盒进行建库的实验步骤**

**起始DNA量：1-500ng**

**1. 末端修复和加尾**

1.1如下配制反应体系

|  |  |
| --- | --- |
| **组分** | **体积** |
| Fragmented, double-stranded DNA | 25 μl |
| End Repair & A-Tailing Buffer | 3.5 μl |
| End Repair & A-Tailing Enzyme Mix | 1.5 μl |
| **总体积** | **30 μl** |

1.2充分混匀并简单离心。

1.3置于PCR仪中，反应设置如下：20°C 30min，65°C 30min，4°C保持。

1.4**立即**进行下一步。

**2. 接头连接**

1.1 如下配制反应体系

|  |  |
| --- | --- |
| **组分** | **体积** |
| End Repair & A-Tailing reaction product | 30 μl |
| PCR-grade water | 2.5 μl |
| Ligation Buffer | 15 μl |
| DNA Ligase | 5 μl |
| 1:10 diluted Adapter stock | 2.5 μl |
| **总体积** | **55 μl** |

1.2**立即**充分混匀并简单离心。20°C孵育30min，4°C停止。

1.3迅速加入1.5μl **USER酶**，37°C反应30min。

**3. 连接后纯化：**将样品置于磁力架，弃去上清，200μl EB溶液清洗一遍，再用21μl水重悬磁珠。

**4. 文库扩增**

4.1如下配制反应体系

|  |  |
| --- | --- |
| **组分** | **体积** |
| 2X KAPA HiFi HotStart ReadyMix | 25 μl |
| QP2 primer (10uM) | 2 μl |
| NEB short universal primer (10uM) | 2 μl |
| Adapter-ligated library | 21 μl |
| **总体积** | **50 μl** |

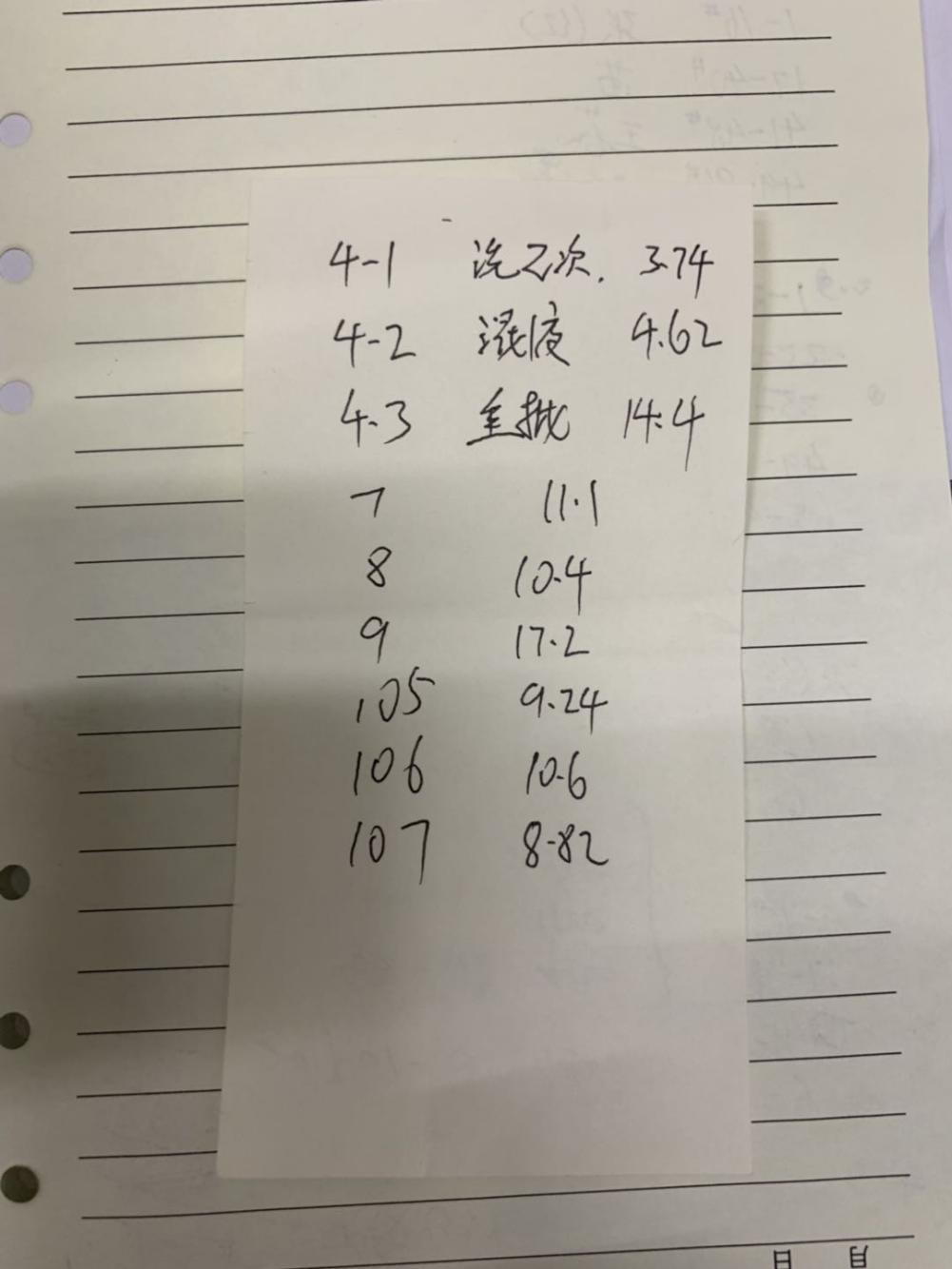
4.2**立即**充分混匀并简单离心。

4.3置于PCR仪中，反应设置如下：

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 步骤 | 温度 | 时间 | 循环数 |
| 初始变性 | 98°C | 45 sec | 1 |
| 变性 | 98°C | 15 sec | 7 |
| 退火 | 65°C | 30 sec |
| 延伸 | 72°C | 30 sec |
| 终末延伸 | 72°C | 1 min | 1 |
| 保持 | 4°C | ∞ | 1 |

4.4 可保存于4 °C或-20 °C中，最多72小时。或直接进行最后一步。

**5. 扩增后纯化：**样品置于磁力架，转移上清至一新的PCR管。用40μl XP（0.8x）磁珠纯化两次（方法同上），最后用50μl水洗脱。可取1μl 洗脱产物Qubit DNA（HS）抽测浓度（浓度约5-10ng/ul左右）。取100ng/样本（约20μl）转移至1.5ml离心管，送样诺和致源进行后续质检和测序。

****