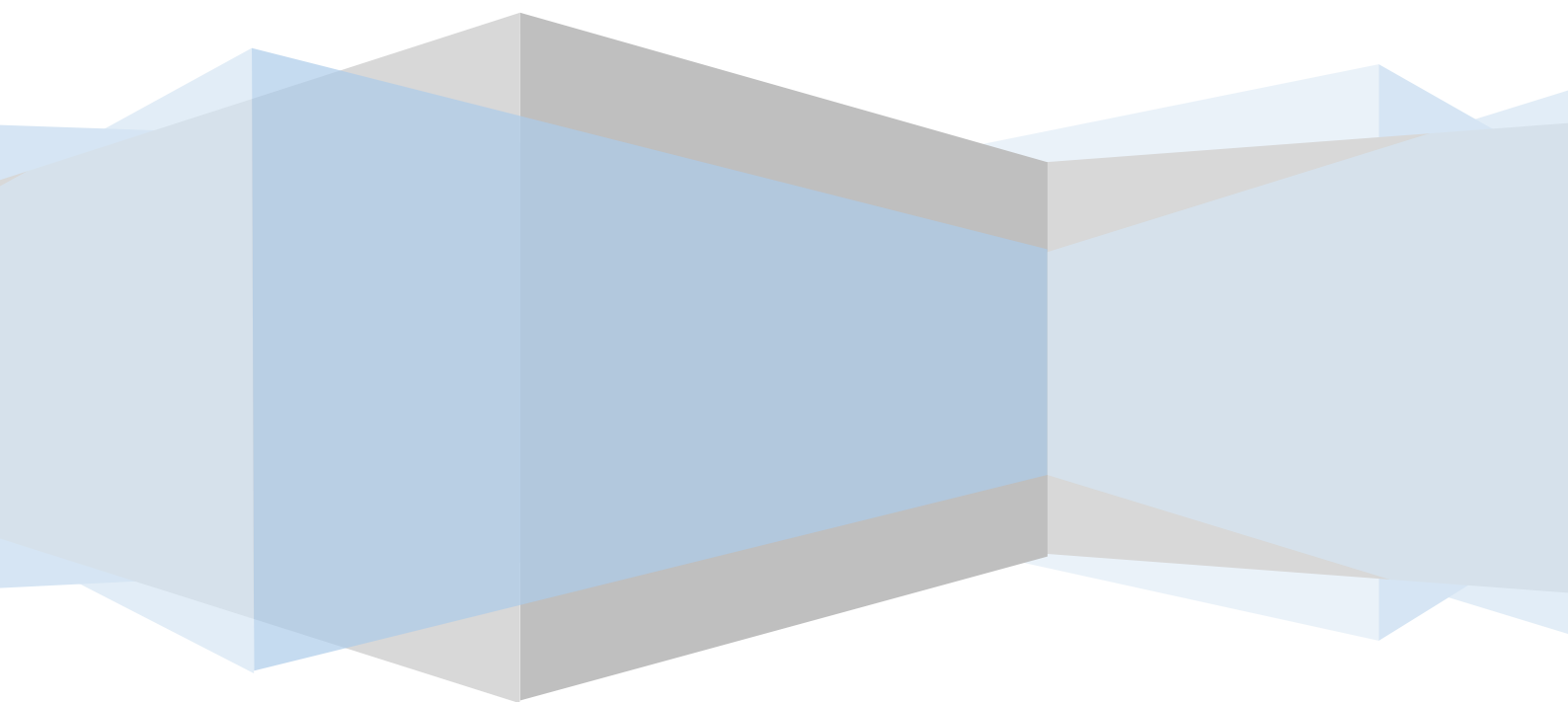


上海欧易生物医学科技有限公司

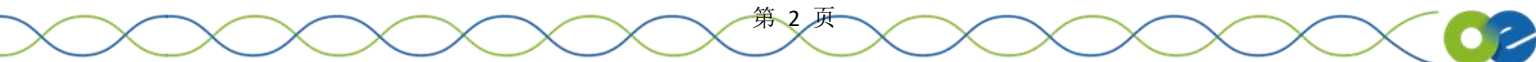
10× genomics

V3.1 (3' 转录组) 建库流程



目录

1.试剂及仪器	3
1.1 主要试剂:	3
1.2 主要仪器耗材	3
2 实验步骤	4
2.1.1 GEM Generation & Barcoding	4
2.1.2 Loading the Single Cell Chip G	4
2.1.3 Transferring GEMs and GEM-RT Incubation	5
2.1.4 Post GEM-RT Cleanup & cDNA Amplification Tips	5
2.1.5 cDNA Amplification Reaction	6
2.1.6 cDNA Cleanup &cDNA QC & Quantification.....	7
2.2.1 Fragmentation, End Repair & A-tailing	8
2.2.2Post Fragmentation, End Repair & A-tailing Double Sided Size Selection – SPRIselect.....	8
2.2.3 Adaptor Ligation	9
2.2.4 Post Ligation Cleanup – SPRIselect.....	9
2.2.5 Sample Index PCR	9
2.2.6 Post Sample Index PCR Double Sided Size Selection – SPRIselect	11
3 文库质检	11



1. 试剂及仪器

1.1 主要试剂:

试剂名称	试剂来源	Cat.No.	试剂用量 (一次反应)
Chromium Next GEM Single Cell 3' GEM, Library & Gel Bead Kit v3.1	Chromium	PN-1000121	1个反应
Qubit dsDNA Assay Kit	Life Technologies	Q328520	1 个反应
DynaBeads® MyOne™ Silane Beads*	Life Technologies	37002D	4μl
Agilent High Sensitivity DNA Kit	Agilent	5067-4626	1张
SPRIselect Reagent Kit	Life Technologies	B23318	260μl
Buffer EB		19086	192.5μl

1.2 主要仪器耗材

仪器名称	仪器来源	型号
台式离心机	eppendorf	Centrifuge 5418R
PCR 仪	Bio-rad	MyCycler
定量仪	Invitrogen	Qubit3.0
磁力架	Chromium	10×Magnetic H
Bioanalyzer	Agilent	2100
Eppendorf PCR Tubes, 0.2 mL	eppendorf	0030124.359
振荡仪		Vortex-6

2 实验步骤

2.1.1 GEM Generation & Barcoding

a. 在冰上配制 **Master Mix**

Master Mix <i>Add reagents in the order listed</i>	PN	1X (μl)	4X + 10% (μl)	8X + 10% (μl)
● RT Reagent B	2000165	18.8	82.2	165.0
● Template Switch Oligo	3000228	2.4	10.4	20.8
○ Reducing Agent B	2000087	2.0	8.6	17.3
● RT Enzyme C	2000085/ 2000102	8.7	38.4	76.8
Total	-	31.8	139.9	279.8

b. 分装 31.8 μl Master Mix 于八连排中备用（冰上放置）

2.1.2 Loading the Single Cell Chip G

a. 如果样本少于8个，按照如下顺序加入同等体积的50%甘油到不同的10×芯片相应孔中

i. 70 μl in the row labeled 1

ii. 50 μl in the row labeled 2

iii. 45 μl in the row labeled 3

b. 取70 μl Master Mix+Cells于加样孔中



c. 振荡 Gel Beads（-80℃取出，室温放置 30min）

d. 加样顺序如下图



e. 贴上10×Gasket，上10×机器（大约18min）。

2.1.3 Transferring GEMs and GEM-RT Incubation


- 吸取 100µl 油包水于新的（预冷的）八连排中。（油包水在冰上放置，不要超过一小时）
- PCR 程序如下

Lid Temperature		Reaction Volume	Run Time
53°C		125 µl	~55 min
Step	Temperature		Time
1	53°C		00:45:00
2	85°C		00:05:00
3	4°C		Hold

c. PCR 产物可以在 4°C 放置 72h、-20°C 放置一周或者立即进行下一步。

2.1.4 Post GEM-RT Cleanup & cDNA Amplification Tips

- 加125 µl Recovery Agent于反应液中（不能吹打混匀），室温静置2min，丢弃125 µl Recovery Agent/Partitioning Oil (pink) （不能吸到上清）
- 配制Dynabeads Cleanup Mix和Elution Buffer I

Dynabeads Cleanup Mix <i>Add reagents in the order listed</i>	PN	1X (μl)	4X + 10% (μl)	8X + 10% (μl)
<input checked="" type="radio"/> Cleanup Buffer	2000088	182	801	1602
 Dynabeads MyOne SILANE Vortex thoroughly (≥30 sec) immediately before adding to the mix. If still clumpy, pipette mix to resuspend completely. DO NOT centrifuge before use.	2000048	8	35	70
Reducing Agent B	2000087	5	22	44
Nuclease-free Water		5	22	44

Elution Solution I <i>Add reagents in the order listed</i>	PN	1X (μl)	10X (μl)
Buffer EB	-	98	980
10% Tween 20	-	1	10
<input type="radio"/> Reducing Agent B	2000087	1	10
Total	-	100	1000

- c. 加 200μl Dynabeads Cleanup Mix，混匀，室温静置 10min，磁力架上放置至澄清
- d. 弃上清，加入 300 μl 新鲜配制的 80% 的乙醇，室温 30 s，弃上清
- e. 加入 200 μl 新鲜配制的 80% 的乙醇，室温 30 s，弃上清，轻离心，放置磁力架，去除剩余酒精气干 1min
- f. 加 35.5μl Elution Buffer I，混匀，室温 1min，磁力架至澄清，吸 35μl 上清于新管中

2.1.5 cDNA Amplification Reaction

- a. 加 65μl cDNA Amplification Reaction Mix 于 35μl of purified GEM-RT 中，混匀

cDNA Amplification Reaction Mix <i>Add reagents in the order listed</i>	PN	1X (μl)	4X + 10% (μl)	8X + 10% (μl)
<input type="radio"/> Amp Mix	2000047/ 2000103	50	220	440
<input checked="" type="radio"/> cDNA Primers	2000089	15	66	132
Total	-	65	286	572

b. PCR 反应（按照细胞回收数设置 PCR 反应循环数）

Lid Temperature	Reaction Volume	Run Time
105°C	100 µl	~30-45 min
Step	Temperature	Time
1	98°C	00:03:00
2	98°C	00:00:15
3	63°C	00:00:20
4	72°C	00:01:00
5	Go to Step 2, see table below for total # of cycles	
6	72°C	00:01:00
7	4°C	Hold

Targeted Cell Recovery	Total Cycles
<500	13
500–6,000	12
>6,000	11

c. PCR 产物可以 4°C 放置 72h 或进行下一步

2.1.6 cDNA Cleanup & cDNA QC & Quantification

- 反应结束后加入 60 µl SPRIselect Reagent，混匀，室温静置 5min，磁力架上至澄清，弃上清
- 加入 200 µl 新鲜配制的 80% 的乙醇，室温 30 s，弃上清，重复一次，气干
- 加入 40.5 µl Buffer EB，混匀，室温 1min，磁力架上至澄清，吸 40 µl 上清于新管中
- Qubit 质检以及 Agilent 2100 质检，记录浓度。
- 纯化后产物可以 4°C 放置 72h、-20°C 放置 4 周或者立即进行下一步。

2.2.1 Fragmentation, End Repair & A-tailing

- 准备PCR程序，进行预冷
- 配制Fragmentation Mix（全程必须在冰上配制试剂及加样）

Fragmentation Mix <i>Add reagents in the order listed</i>	PN	1X (μl)	4X + 10% (μl)	8X + 10% (μl)
● Fragmentation Buffer	2000091	5	22	44
● Fragmentation Enzyme	2000090/ 2000104	10	44	88
Total	-	15	66	132

- 每个样本取 10μl cDNA，补 Buffer EB 25μl，加入 15μl Fragmentation Mix，混匀（全程必须在冰上配制试剂及加样）
- PCR反应

Lid Temperature	Reaction Volume	Run Time
65°C	50 μl	~35 min
Step	Temperature	Time
Pre-cool block <i>Pre-cool block prior to preparing the Fragmentation Mix</i>	4°C	Hold
Fragmentation	32°C	00:05:00
End Repair & A-tailing	65°C	00:30:00
Hold	4°C	Hold

2.2.2 Post Fragmentation, End Repair & A-tailing Double Sided Size Selection – SPRIselect

- 加入 30μl SPRIselect Reagent，混匀，室温静置 5min，磁力架上至澄清
- 取 75μl 上清于新管中，加入 10μl SPRIselect Reagent，混匀，室温静置 5min，磁力架上至澄清，去上清
- 加入 125μl 新鲜配制的 80%的乙醇，室温 30 s，弃上清，重复一次，气干
- 加入 50.5μl Buffer EB，混匀，室温 1min，磁力架上至澄清，吸 50μl 上清于新管中

2.2.3 Adaptor Ligation

a. 配 Adaptor Ligation Mix, 加入 50 μ l, 混匀

Adaptor Ligation Mix <i>Add reagents in the order listed</i>	PN	1X (μ l)	4X + 10% (μ l)	8X + 10% (μ l)
● Ligation Buffer	2000092	20	88	176
● DNA Ligase	220110/ 220131	10	44	88
● Adaptor Oligos	2000094	20	88	176
Total	-	50	220	440

b. PCR 条件:

Lid Temperature	Reaction Volume	Run Time
30°C	100 μ l	15 min
Step	Temperature	Time
1	20°C	00:15:00
2	4°C	Hold

2.2.4 Post Ligation Cleanup – SPRIselect

a. 加入 80 μ l SPRIselect Reagent, 混匀, 室温静置 5min, 磁力架上至澄清, 弃上清

b. 加 200 μ l 新鲜配制的 80% 的乙醇, 室温 30 s, 弃上清, 重复一次, 气干

c. 加入 30.5 μ l Buffer EB, 混匀, 室温 2min, 磁力架上至澄清, 吸 30 μ l 上清于新管中

2.2.5 Sample Index PCR

a. 制备 Sample Index PCR Mix

Sample Index PCR Mix <i>Add reagents in the order listed</i>	PN	1X (μl)	4X + 10% (μl)	8X + 10% (μl)
○ Amp Mix	2000047/ 2000103	50	220	440
● SI Primer	2000095	10	44	88
Total	-	60	264	528

b. 加入 60μl Sample Index PCR Mix，混匀

c. 加入10 μl of an individual Chromium i7 Sample Index，混匀，进行PCR

Lid Temperature	Reaction Volume	Run Time
105°C	100 μl	~25-40 min
Step	Temperature	Time
1	98°C	00:00:45
2	98°C	00:00:20
3	54°C	00:00:30
4	72°C	00:00:20
5	Go to step 2, see below for # of cycles	
6	72°C	00:01:00
7	4°C	Hold

cDNA Input	Total Cycles
0.25-25 ng	14-16
25-150 ng	12-14
150-500 ng	10-12
500-1,000 ng	8-10
1,000-1,500 ng	6-8
>1500 ng	5

2.2.6 Post Sample Index PCR Double Sided Size Selection – SPRIselect

- a. 加入 60 μ l SPRIselect Reagent, 混匀, 室温静置 5min, 磁力架上至澄清
- b. 取 150 μ l 上清于新管中, 加入 20 μ l SPRIselect Reagent, 混匀, 室温静置 5min, 磁力架上至澄清, 去上清
- c. 加入 200 μ l 新鲜配制的 80% 的乙醇, 室温 30 s, 弃上清, 重复一次, 气干
- d. 加入 35.5 μ l Buffer EB, 混匀, 室温 2min, 磁力架上至澄清, 吸 35 μ l 上清于新管中

3 文库质检