

10×genomics 建库流程（3'转录组）V3

1. 试剂及仪器

1.1 主要试剂：

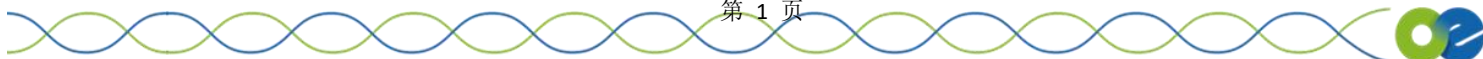
试剂名称	试剂来源	Cat.No.	试剂用量 (一次反应)
Chromium Single Cell 3' Library & Single Cell 3' v3 Gel Beads	Chromium	PN-1000075	1个反应
Qubit dsDNA Assay Kit	Life Technologies	Q328520	1 个反应
DynaBeads® MyOne™ Silane Beads*	Life Technologies	37002D	4μl
Agilent High Sensitivity DNA Kit	Agilent	5067-4626	1张
SPRIselect Reagent 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 GEM Generation & Barcoding



Master Mix <i>Add reagents in the order listed</i>	PN	1X (μl)	4X + 10% (μl)	8X + 10% (μl)
● RT Reagent	2000086	20.0	88.0	176.0
● Template Switch Oligo	3000228	3.1	13.9	27.7
○ Reducing Agent B	2000087	2.0	8.7	17.3
● RT Enzyme C	2000085/ 2000102	8.3	36.6	73.1
Total	-	33.4	147.1	294.2

分装 33.4μl Master Mix 于八连排中

2.2 Loading the Single Cell Chip A

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

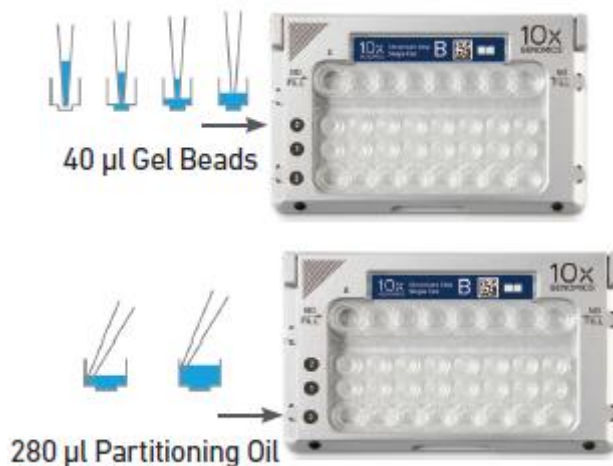
- 75 μl in the row labeled 1
- 40 μl in the row labeled 2
- 280 μl in the row labeled 3

b. 取75μl Master Mix+Cells于加样孔中



c. 振荡 Gel Beads (-80℃取出，室温放置 30mins)

d. 加样顺序如下图



- e. 贴上10×Gasket, 上10×机器 (大约8.5mins)。

2.3 油包水反应

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

2.4 萃取及 cDNA 富集

- a. 萃取

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

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 Version Specific Updated Temperature	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

2.5 纯化和质检

- a. 反应结束后加入 60 µl SPRIselect Reagent 纯化
- b. 2100 质检

2.6 建库

- 2.6.1 片段化、末端修复、加A, PCR反应

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

2.7 磁珠纯化

- 加入 30µlSPRIselect Reagent 纯化
- 加入 50.5µlBuffer EB 洗脱

2.8 连接

- 配 Adaptor Ligation Mix, 加入 50µl, 混匀
- PCR 条件:

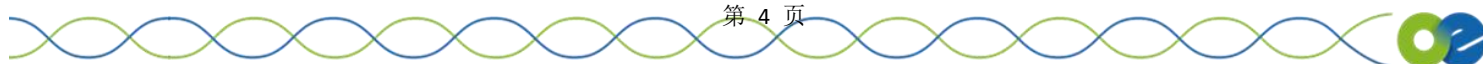
Lid Temperature	Reaction Volume	Run Time
30°C	100 µl	15 min
Step	Temperature	Time
1	20°C	00:15:00
2	4°C	Hold

2.9 纯化

- 加入 80µlSPRIselect Reagent 纯化
- 加入 30.5µlBuffer EB 洗脱

2.10 样本 Index PCR

- 加入 60µl Sample Index PCR Mix, 混匀
- 加入 10 µl of an individual Chromium i7 Sample Index



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

2.11 片段分选

- 加入 60 µl ISPRIsselect Reagent，混匀，室温静置 5mins，磁力架上至澄清
- 取 150 µl 上清于新管中，加入 20 µl ISPRIsselect Reagent 纯化
- 加入 35.5 µl lBuffer EB 洗脱

3 文库质检

3.1 Qubit 测浓度

3.2 2100 质检（高灵敏芯片），条带集中在 400-600bp

