

10×单细胞测序V3 STEP2、3步骤整理

STEP 2 GEM-RT 后清洗& cDNA 扩增

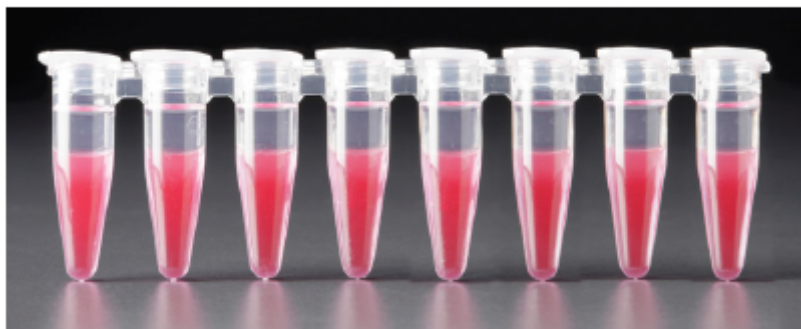
试剂/仪器准备

实验前操作	试剂	注意事项	储存
室温解冻	Reducing Agent B	解冻，涡旋震荡，确认无沉淀，离心。	-20°C
室温解冻	cDNA Primers（绿色瓶盖）	涡旋震荡，短暂离心。	-20°C
室温解冻	Dynabeads MyOne SILANE	加入到混合液之前彻底涡旋震荡 (≥30秒)	-4°C
置于冰上	Amp Mix（白色瓶盖）	涡旋震荡，短暂离心	-20°C
65°C解冻	Cleanup Buffer（灰色瓶盖）	涡旋震荡，短暂离心，确保无絮状物沉淀	-20°C
室温放置	Recovery Agent（白色瓶盖，粉色油状液体）	-	室温
室温放置	Qiagen Buffer EB	-	室温
室温放置	Bio-Rad 10% Tween 20	粘稠，需要缓慢吹打	室温
室温放置	10x Magnetic Separator（磁力架）	-	室温
室温放置	80% Ethanol	-	室温
室温放置	Beckman Coulter SPRIselect Reagent	使用前涡旋震荡，混匀	室温

2.1 使用Dynabeads进行GEM-RT后的清洗

1. 在室温下向每个样品加入125 µl Recovery Agent，沿着管壁缓慢转圈加，在不吹打的前提下尽量充分混匀，不要用移液枪吹打或震荡，静置2分钟。

Biphasic Mixture



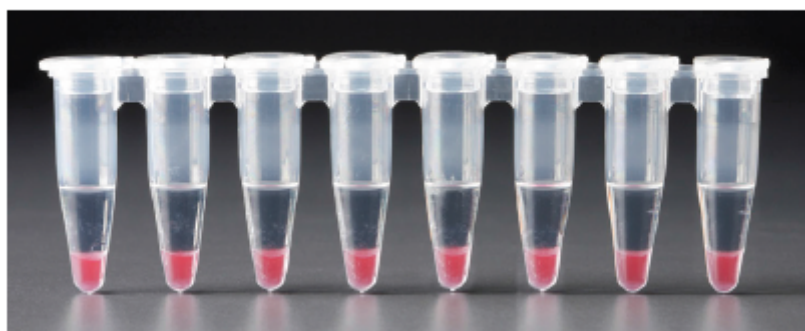
如图，加入Recovery Agent 后混合液分层：粉色的Recovery Agent/分化油层与透明的水层，不会出现不透明的浑浊。

如果分层不完全。将管盖盖紧，确保盖与管口之间无液体残留。上下翻转5次以混匀，短暂离心，然后进行下一步。

如果水层体积较小，说明在GEM生成过程中产生了堵塞。

2. 缓慢地从试管底部吸弃125 μ l Recovery Agent/分化油（粉色层），不要吸出透明水层。

Remove Recovery Agent



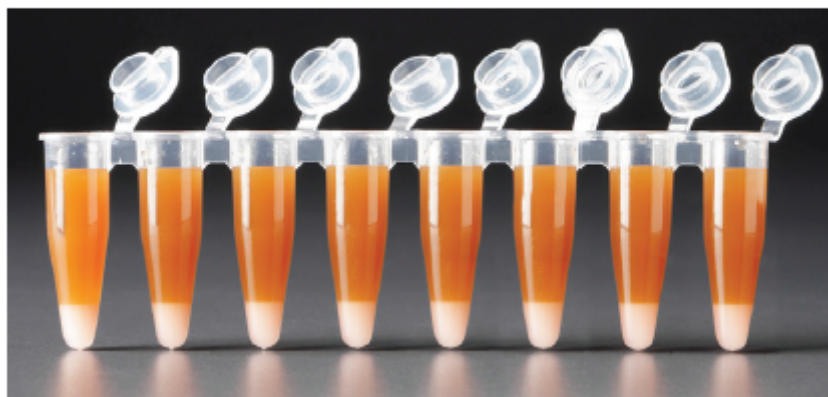
3. 按表格配制Dynabeads Cleanup Mix，震荡混匀。

试剂 (μ l)	1 \times	2.2 \times	3.3 \times	4.4 \times	5.5 \times	6.6 \times	7.7 \times	8.8 \times
Cleanup Buffer	182	400	600.6	801	1001	1201	1401	1602
Dynabeads MyOne SILANE (注意：操作前需要彻底震荡混匀，切勿离心)	8	18	26.4	35	44	53	62	70
Reducing Agent B	5	11	16.5	22	27.5	33	38.5	44
Nuclease-free Water/DEPC水	5	11	16.5	22	27.5	33	38.5	44
总计	200	440	660	880	1100	1320	1540	1760

为了抵消实验操作中可能出现的Mix损耗，故配制多样本体系时为 $n \times +10\%$ (μ l)

- 向每个样品中添加200 μ l Dynabeads Cleanup Mix，使用移液枪吹打10次混匀（移液枪调至200 μ l，且吹打时注意不要让混合液溢出，枪头随着液面下伸/抬起，尽量保证能够吹打均匀。）
- 室温静置孵育10 min，孵育五分钟后再次吹打混匀。

Add Dynabeads Cleanup Mix



6. 按表格配制洗脱液 Elution Solution I，涡旋震荡，短暂离心。

试剂 (μl)	1/2个样品	3/4/5个样品	6/7个样品	8/9/10个样品
Buffer EB	98	196	294	392
10% Tween 20	1	2	3	4
Reducing Agent B	1	2	3	4
总计	100	200	300	400

由于10% Tween 20过于粘稠，故不严格按照n × 10%体系配制。

7. 待到10 min孵育结束后，将样品置于10 × 磁力架HIGH位，直至混合液变澄清。

水层与Recovery层交界处有白色层为正常现象。

7. 弃上清液。

8. 于磁力架上的样品加入300 μl 80%乙醇，等待30 s。

9. 弃去乙醇。

10. 于磁力架上的样品加入200 μl 80%乙醇，等待30 s。

11. 弃去乙醇。

12. 短暂离心，置于磁力架LOW位。

13. 去除剩余乙醇，干燥1 min。

14. 从磁力架上取下样品，立即加入35.5 μl洗脱液Elution Solution I。

15. 使用移液枪吹打混匀（移液枪调至30 μl，小心不要吹出气泡）。

16. 室温孵育2 min。

17. 置于磁力架LOW位，直至溶液变澄清。

18. 转移35 μl样品于新管中。

2.2 cDNA 扩增

1. 按表格于冰上配制cDNA Amplification Mix. 震荡混匀，短暂离心。

试剂 (μl)	1×	2.2×	3.3×	4.4×	5.5×	6.6×	7.7×	8.8×
Amp Mix	50	110	165	220	275	330	385	440
cDNA Primers	15	33	49.5	66	82.5	99	115.5	132
总计	65	143	215.5	286	357.5	429	500.5	572

- 2. 将65 µl cDNA Amplification Mix 加入到先前的35 µl 样品中。
- 3. 使用移液枪吹打混匀15次（移液枪调至90 µl），短暂离心。
- 4. 于PCR 仪中按如下程序进行cDNA 扩增。

热盖温度	反应体系	反应所需时间
105 °C	100 µl	30-45 min
步骤	温度 (°C)	时间
1	98	00:03:00
2	98	00:00:15
3	63	00:00:20
4	72	00:01:00
5	回到第2步，循环12次	
6	72	00:01:00
7	4	——

- 5. 置于4°C下储存72 h或置于-20°C下储存≤1周，或进入下一步。

2.3 使用SPRIselect 进行cDNA 扩增后的清洗

- 1. 涡旋震荡混匀SPRIselect，在每个样品中加入 60 µl SPRIselect (0.6X)，使用移液枪吹打混匀15次（移液枪调至150 µl）。
- 2. 室温孵育5 min。
- 3. 置于磁力架HIGH位，直至溶液变澄清。
- 4. 弃上清液。
- 5. 向管中加入200µl 80% 乙醇，静置30 s。
- 6. 去除乙醇。
- 7. 重复5.、6步（一共用80% 乙醇洗涤2 次）
- 8. 短暂离心，置于磁力架LOW 位。
- 9. 去除剩余的乙醇，干燥2 min，但不能超过2 min以免降低洗脱效率。
- 10. 从磁力架取下样品，加入40.5 µl Buffer EB。用移液器吹打混匀15次。
- 11. 室温静置孵育2 min。
- 12. 样品置于磁力架HIGH 位，直至溶液变澄清。
- 13. 将40 µl样品转移至新的管中。
- 14. 置于4°C保存72 h，或是置于 -20°C 下保存 4 周，或进行下一步。

注意事项

- 1. 排枪的使用：精细的样品转移（管内有磁珠etc）不建议使用排枪进行转移，用乙醇洗涤，批量加入EB 可以使用排枪。
- 2. 最好在STEP 1 完成后1 周内进行STEP 2。

STEP 3 3' 基因表达文库的构建

试剂/仪器准备

实验前操作	试剂	注意事项	储存
室温解冻	Fragmentation Buffer (紫色瓶盖)	涡旋震荡, 确认无沉淀, 短暂离心	-20°C
室温解冻	Adaptor Oligos	涡旋震荡, 短暂离心	-20°C
室温解冻	Ligation Buffer	涡旋震荡, 确认无沉淀, 短暂离心	-20°C
室温解冻	SI Primer	-	-20°C
室温解冻	Single Index Plate T Set A	加入Index时应该注意做好对应孔的使用记录, 戳破铝箔时可以枪头抵着管壁戳进去, 减少液体溅出可能性, 增加Index使用次数	-20°C
置于冰上	Fragmentation Enzyme	短暂离心	-20°C
置于冰上	DNA Ligase	短暂离心	-20°C
置于冰上	Amp Mix	短暂离心	-20°C
室温放置	Qiagen Buffer EB	-	室温
室温放置	80% Ethanol	-	室温

实验前操作	试剂	注意事项	储存
室温放置	Beckman Coulter SPRIselect Reagent	使用前涡旋震荡混匀	室温
室温放置	10x Magnetic Separator (磁力架)	-	

3.1 片段化、末端修复和添加“A”尾

1. 在PCR 仪上按照如下程序进行cDNA 片段化（先预冷）

热盖温度	反应体系	反应所需时间
65°C	50 µl	35 min左右
步骤	温度	时间
Pre-cool block（先预冷，样品上机片段化时按SKIP）	4°C	——
Fragmentation	32°C	00:05:00
End Repair & A-tailing	65°C	00:30:00
Hold	4°C	——

2. 涡旋震荡Fragmentation Buffer，确认无沉淀。
3. 按表格在冰上配制Fragmentation Mix，吹打混匀，离心。

试剂（按顺序加）（µl）	1×	2.2×	3.3×	4.4×	5.5×	6.6×	7.7×	8.8×
Fragmentation Buffer	5	11	16.5	22	27.5	33	38.5	44
Fragmentation Enzyme	10	22	33	44	55	66	77	88
Total	15	33	49.5	66	82.5	99	115.5	132

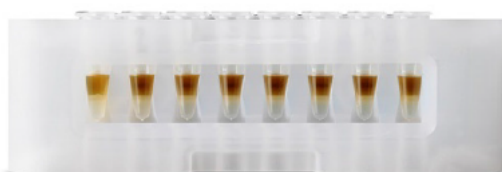
4. 将STEP 2 中的cDNA吸取10 µl于新管中，剩余的30 µl cDNA样品置于-20°C可以保存4 周。
5. 每样品中加入25 µl Buffer EB。
6. 向每个样品中加入15 µl Fragmentation Mix。
7. 于冰上使用移液枪吹打混匀15次（移液枪调至35 µl），短暂离心。
8. 转移至已经4°C预冷好的PCR仪中，按SKIP，启动剩余程序。

3.2 片段化、末端修复和添加“A”尾后使用SPRIselect进行Double Sided Size Selection

1. 涡旋震荡以重悬混匀SPRIselect，于每个样品中加入30 μ l SPRIselect (0.6X)，用移液枪吹打混匀15次，（移液器调至75 μ l）。
2. 室温孵育5 min。
3. 置于磁力架HIGH位直至溶液变澄清，不要丢弃上清液。



4. 将75 μ l上清液转移到新的试管中。
5. 涡旋震荡以重悬混匀 SPRIselect，在每个样品中加入 10 μ l SPRIselect (0.8X)，用移液枪吹打混匀15次（移液枪调至80 μ l）。
6. 室温孵育5 min。
7. 置于磁力架HIGH位，直至溶液变澄清。



8. 洗出80 μ l上清液，不要弃去磁珠。
9. 向有磁珠的试管中加入125 μ l 80%的乙醇，等待30秒。
10. 去除乙醇。
11. 重复步骤9和10，共洗2次。
12. 短暂离心，放在磁铁LOW位，直到溶液变澄清。除去剩余的乙醇，不要过度干燥以确保最大的洗脱效率。
13. 从磁力架上取下试管，于每个样品中加入50.5 μ l Buffer EB，用移液枪吹打混匀15次。
14. 于室温孵育2 min。
15. 将试管置于磁力架HIGH位，直到溶液变澄清。
16. 将50 μ l样品转移到新的试管中。

3.3 Adaptor 连接

1. 按表格顺序配制Adaptor Ligation Mix，吹打混匀，短暂离心

试剂 (μ l)	1 \times	2.2 \times	3.3 \times	4.4 \times	5.5 \times	6.6 \times	7.7 \times	8.8 \times
Ligation Buffer	20	44	66	88	110	132	154	176
DNA Ligase	10	22	33	44	55	66	77	88
Adaptor Oligos	20	44	66	88	110	132	154	176
总计	50	110	165	220	275	330	385	440

2. 将50 μ l Adaptor Ligation Mix 加入到50 μ l 样品中，使用移液枪吹打混匀15次（移液枪调至90 μ l），短暂离心

3. 在PCR仪中按照以下程序进行孵育。

热盖温度	反应体系	程序所需时间
30℃	100 μl	15 min
步骤	温度	时间
1	20℃	00:15:00
2	4℃	Hold

3.4 使用SPRIselect 进行连接后清洗

- 1. 涡旋震荡以重悬SPRIselect Reagent，在每个样品中加入80 μl SPRIselect Reagent（0.8X），使用移液枪吹打混匀15次（移液枪调至150 μl）。
- 2. 室温孵育5 min。
- 3. 置于磁力架HIGH位，直至溶液变澄清。
- 4. 弃上清液。
- 5. 向样品中加入200μl 80%的乙醇，静置30 s。
- 6. 去除乙醇。
- 7. 重复步骤5和6，共进行2次洗涤。
- 8. 短暂离心，置于磁力架LOW位。
- 9. 取出任何剩余的乙醇，空气干燥2分钟。不要超过2分钟，因为这将降低洗脱效率。
- 10. 从磁力架上取下，加入 30.5 μl Buffer EB。用移液枪吹打混匀15次。
- 11. 在室温孵育2 min。
- 12. 置于磁力架Low位，直至溶液变澄清。
- 13. 将30 μl样品转移到新的试管中。

3.5 Sample Index PCR

- 1. 按表格准备Sample Index PCR Mix.

试剂 (μl)	1×	2.2×	3.3×	4.4×	5.5×	6.6×	7.7×	8.8×
Amp Mix	50	110	165	220	275	330	385	440
SI Primer	10	22	33	44	55	66	77	88
总计	60	132	198	264	330	396	462	528

- 2. 将60 μl Sample Index PCR Mix加入30μl样品中。
- 3. 在每个样品中加入 10 μl Single Index，并记录所用的Index 编号。用移液枪吹打混匀5 次（移液枪调至90 μl），短暂离心。

Index每孔20 μl，可用枪头贴着孔边缘戳进去，减少Index溅出损耗。

- 4. 在PCR仪中用以下程序进行孵育。

热盖温度	反应体系	程序所需时间
105°C	100 µl	25-40 min
步骤	温度	时间
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	回到第二步，循环13次（详见注释）	——
6	72°C	00:01:00
7	4°C	Hold

推荐循环次数：

cDNA量	总循环数
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

5. 在4°C下储存72小时，或进行下一步操作。

3.6 Sample Index后使用SPRIselect进行Double Sided Size Selection

- 涡旋震荡以重悬SPRIselect Reagent，在每个样品中加入 60 µl SPRIselect Reagent（0.6X）。用移液枪吹打混匀15次（移液枪调至150 µl）。
- 在室温孵育 5 min。
- 将磁力架置于HIGH位，直至溶液变澄清，不要弃上清液。
- 将150 µl上清液转移到新的试管中。
- 涡旋震荡以重悬SPRIselect Reagent，在每个样品中加入20 µl SPRIselect Reagent（0.8X）。用移液枪吹打混匀15次（移液枪调至150 µl）。
- 在室温下孵育5 min。
- 将磁力架置于HIGH位，直到溶液变澄清。
- 弃165 µl上清液。不要丢弃任何磁珠。
- 仍将试管仍置于磁力架上，向管中加入 200 µl 80% 乙醇。等待30 s。
- 除去乙醇。
- 重复步骤9和10，共洗2次。
- 短暂离心，置于磁力架LOW位。去除剩余的乙醇。
- 从磁力架上取下。加入 35.5 µl Buffer EB。用移液枪混匀15次。
- 在室温孵育2 min。

15. 置于磁力架LOW位，直到溶液变澄清。
16. 将 35 μ l 样品转移到新的小EP管中。
17. 在 4°C 储存 72 小时，或在 -20°C 长期储存。做好记录送测序。