

10×单细胞测序 V5-step6:5' Gene Expression (GEX) Library Construction

整理人：刘可钦

6.0 5' Gene Expression (GEX) Library Construction

【试剂准备】

试剂	试剂存储位置	试剂取用期间存储标准	试剂编号	试剂取用期间操作标准	试剂长期储存标准
Fragmentation Buffer	-20℃ 冰箱下部中层试剂盒内	室温放置	220108	解冻，涡旋震荡，确认无沉淀，快速离心	-20℃ 存储
Adaptor Mix	-20℃ 冰箱下部中层试剂盒内	室温放置	220026	涡旋震荡，快速离心	-20℃ 存储
Ligation Buffer	-20℃ 冰箱下部中层试剂盒内	室温放置	220109	解冻，涡旋震荡，确认无沉淀，快速离心	-20℃ 存储
SI-PCR Primer	-20℃ 冰箱下部中层试剂盒内	室温放置	220111	涡旋震荡，快速离心	-20℃ 存储
Chromium i7 Sample Index Plate	实验台 冰箱下层	室温放置	220103	解冻	-20℃ 存储
	实验台				

Equalbit dsDNA HS Assay Kit	冰箱上层	室温放置	/	现用现配	4°C 存储
Beckman Coulter SPRiselect Reagent	实验台	室温放置	/	在用于配置混匀液前涡旋震荡≥30秒，如仍有块状物，应使用移液枪吹打混匀；使用前不可离心。	室温存储
Fragmentation Enzyme Blend	-20°C 冰箱下部中层试剂盒内	冰盒放置	220107 /220130	快速离心	-20°C 存储
DNA Ligase	-20°C 冰箱下部中层试剂盒内	冰盒放置	220110 /220131	快速离心	-20°C 存储
Amplification Master Mix	-20°C 冰箱下部中层试剂盒内	冰盒放置	220125	涡旋震荡，快速离心	-20°C 存储
Qiagen Buffer EB	实验台	室温放置	/	/	室温存储
10× Magnetic Separator	实验台	室温放置	230003	/	室温存储
Prepare 80% Ethanol Prepare 15ml for 8 reactions	实验台	室温放置	/	现用现配	室温存储

6.1 GEX Fragmentation, End Repair & A-tailing

1. 将样品和写好标签的新PCR管放置在冰上。根据【3.3】测量得到的样品浓度，计算相应样品体积，使吸取的样品达到 50ng，然后将吸取的样品转移到新管内，并用 nuclease-free water 将其补足至 20μl。

如果样品不足 50ng，则吸取 20μl 样品用于 library construction。

此时可将 PCR仪 开始预冷。

2. 按照如下程序设置 PCR仪。

热盖温度	反应容量	反应时间
65°C	50µl	~35min
步骤	温度	时间
Pre-cool block	4°C	Hold
Fragmentation	32°C	00:05:00
End Repair & A-tailing	65°C	00:30:00
Hold	4°C	Hold

此程序名为【10xPRA】

3. 涡旋震荡 Fragmentation Bufffer，确认无沉淀。
4. 在冰上配置 Fragmentation Mix，用移液枪吹打混匀，并快速离心。

	Nuclease-free Water	Fragmentation Buffer	Fragmentation Enzyme Blend	总体积
试剂编号	/	220108	220107 / 220130	/
1x(µl)	15	5	10	30
2x(µl)	33	11	22	66
3x(µl)	49.5	16.5	33	99
4x(µl)	66	22	44	132
5x(µl)	82.5	27.5	55	165
6x(µl)	99	33	66	198
7x(µl)	110.25	36.75	73.5	231
8x(µl)	126	42	84	264
9x(µl)	141.75	47.25	94.5	297
10x(µl)	165	55	110	330
11x(µl)	181.5	60.5	121	363
12x(µl)	198	66	132	396

5. 向每个 20µl 的样本中加入 30µl Fragmentation Mix。
6. 将移液枪的量程调至 30µl，然后吹打混匀 15 次，快速离心。
7. 将样本放入预冷的 PCR 仪 中（4°C），然后按下“skip”开始 PCR 程序。

6.2 GEX Post Fragmentation, End Repair & A-tailing Double Sided Size Selection - SPRIselect

1. 涡旋震荡 SPRIselect Reagent, 向每管样品加入 30 μ l 0.6x SPRIselect Reagent, 然后将移液枪量程调至 75 μ l, 吹打混匀 15 次。

2. 室温下静置 5min。

此时可开始准备新的PCR管, 并写好标签。

3. 将样品放置在 10 \times Magnetic Separator high 上 2 min, 直到样本澄清。

4. 从每管中吸取 75 μ l 澄清液体, 转移至新管。

5. 向每管样品加入 10 μ l 0.8x SPRIselect Reagent, 然后将移液枪量程调至 75 μ l, 吹打混匀 15 次。

6. 室温下静置 5min。

7. 将样品放置在 10 \times Magnetic Separator high 上 2 min, 直到样本澄清。

8. 将PCR管内的上清移除。

避免: 移除 beads 或将 beads 吸入枪头。

9. 清洗第一遍: 保持样品仍然放置在10 \times Magnetic Separator high 上, 向每个PCR管内加入 125 μ l 80% 乙醇, 等待30s。

10. 吸去乙醇。

注意: 样品量较多时, 可使用排枪。

11. 清洗第二遍: 保持样品仍然放置在10 \times Magnetic Separator high 上, 向每个PCR管内加入 125 μ l 80% 乙醇, 等待30s。

12. 吸去乙醇。

注意: 样品量较多时, 可使用排枪。

13. 将样品PCR管取出, 快速离心, 然后放在 10 \times Magnetic Separator low上。

需要: 在快速离心时, 贴在样品PCR管内的 beads 应朝向离心机外侧。

14. 用 200 μ l 移液枪将样品管内残存的乙醇吸除, 但不要使 beads 过干。

需要: (若样品量较多) 应立刻加入50.5 μ l Buffer EB, 防止 beads 过干。

15. 将样品PCR管从 10 \times Magnetic Separator low 上取下, 立刻向每管内加入 50.5 μ l Buffer EB。移液枪量程调制 50 μ l, 每管样品吹打混匀 15 次, 直到管内无块状物残留。

16. 在室温下静置 2min。

17. 将样品PCR管放在 10 \times Magnetic Separator high 上 2min, 直到管内液体澄清。

18. 从每管中吸取 50 μ l 澄清液体, 转移至新管。

6.3 GEX Adaptor Ligation

1. 配置 Adaptor Ligation Mix, 用移液枪吹打混匀, 并快速离心。

	Nuclease-free Water	Ligation Buffer	DNA ligase	Adaptor Mix	总体积
试剂编号	/	220109	220110 / 220131	220026	/
1x(μl)	17.5	20	10	2.5	50
2x(μl)	38.5	44	22	5.5	110
3x(μl)	58	66	33	8	165
4x(μl)	77	88	44	11	220
5x(μl)	96.25	110	55	13.75	275
6x(μl)	116	132	66	16	330
7x(μl)	134.75	154	77	19.25	385
8x(μl)	154	176	88	22	440
9x(μl)	173.25	198	99	24.75	495
10x(μl)	192.5	220	110	27.5	550
11x(μl)	211.75	242	121	30.25	605
12x(μl)	224.4	264	132	33	660

- 向每个 50μl 的样本中加入 50μl Adaptor Ligation Mix，将移液枪量程调至 90μl，然后吹打混匀 15次，快速离心。
- 按照如下程序设置 PCR仪。

热盖温度	反应容量	反应时间
30°C	100μl	15min
步骤	温度	时间
1	20°C	00:15:00
2	4°C	Hold

此程序名为【ada】

6.4 GEX Post Ligation Cleanup -SPRIselect

- 涡旋震荡 SPRIselect Reagent，向每管样品加入 80μl 0.8x SPRIselect Reagent，然后将移液枪量程调至 150μl，吹打混匀 15 次。
- 室温下静置 5min。

此时可开始准备新的PCR管，并写好标签。

3. 将样品放置在 10× Magnetic Separator high 2 min，直到样本澄清。
4. 将PCR管内的上清移除。

避免：移除 beads 或将 beads 吸入枪头。

5. 清洗第一遍：保持样品仍然放置在10× Magnetic Separator high 上，向每个PCR管内加入 200μl 80% 乙醇，等待30s。
6. 吸去乙醇。

注意：样品量较多时，可使用排枪。

7. 清洗第二遍：保持样品仍然放置在10× Magnetic Separator high 上，向每个PCR管内加入 200μl 80% 乙醇，等待30s。
8. 吸去乙醇。

注意：样品量较多时，可使用排枪。

9. 将样品PCR管取出，快速离心，然后放在 10× Magnetic Separator low上。
10. 用 200μl 移液枪将样品管内残存的乙醇吸除，晾干 2min。

需要：（若样品量较多）在秒表计时超过 1min后，应立刻加入35.5μl Buffer EB，防止 beads 过干。

11. 将样品PCR管从 10× Magnetic Separator low 上取下，立刻向每管内加入 35.5μl Buffer EB。移液枪量程调制 30μl，每管样品吹打混匀 15 次，直到管内无块状物残留。
12. 在室温下静置 2min。
13. 将样品PCR管放在 10× Magnetic Separator low 上 2min，直到管内液体澄清。
14. 从每管中吸取 30μl 澄清液体，转移至新管。

6.5 GEX Sample Index PCR

1. 为每个样本选择唯一一个确定的 sample index，不能出现同一个样本加入了两个不同的 sample index 的情况。
2. 记录样本与 sample index 之间的对应情况。

记录在实验台的实验记录本上，同时将样本与sample index之间的对应记录抄写在纸上，之后随样本一起放在塑封袋中。

3. 制备 Sample Index PCR Mix，吹打混匀并快速离心。

	Nuclear-free Water	Amplification Master Mix	SI-PCR Primer	总体积
试剂编号	/	220125	220111	/
1x(μl)	8	50	2	60
2x(μl)	17.6	110	9	264
3x(μl)	26.4	165	6.6	198
4x(μl)	35	220	9	264
5x(μl)	44	275	11	330
6x(μl)	52.8	330	13.2	396
7x(μl)	61.6	385	15.4	462
8x(μl)	70	440	18	528
9x(μl)	79.2	495	19.8	594
10x(μl)	88	550	22	660
11x(μl)	96.8	605	24.2	726
12x(μl)	105.6	660	26.4	792

4. 向每个 60μl 的样本中加入 30μl Sample Index PCR Mix。
5. 向每个样本中加入 10μl 确定且唯一的 Chromium i7 Sample Index，将移液枪量程调至 90μl，然后吹打混匀 5 次，快速离心。
6. 按照如下程序设置 PCR 仪。

热盖温度	反应容量	反应时间
105°C	100µl	~40min
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	Go to step 2, see table below for # cycles	/
6	72°C	00:01:00
7	4°C	Hold

cycle数可按每管样品中含量计算

Input into Library Construction	Total Sample Index Cycles
1-25 ng	16
26-50 ng	14

7. PCR 完成后，样本可储存在 4°C 冰箱内 72h，然后进行下一步。

6.6 GEX Post Sample Index Double Sided Size Selection - SPRIselect

- 涡旋震荡 SPRIselect Reagent，向每管样品加入 60µl 0.6x SPRIselect Reagent，然后将移液枪量程调至 150µl，吹打混匀 15 次。
- 室温下静置 5min。

此时可开始准备新的 PCR 管和新的 0.6ml EP 管，并写好标签。

- 将样品放置在 10× Magnetic Separator high 上 2 min，直到样本澄清。
- 从每管中吸取 150µl 澄清液体，转移至新管。
- 涡旋震荡 SPRIselect Reagent，向每管样品加入 20µl 0.8x SPRIselect Reagent，然后将移液枪量程调至 150µl，吹打混匀 15 次。
- 室温下静置 5min。
- 将样品放置在 10× Magnetic Separator high 上 2 min，直到样本澄清。
- 将PCR管内的上清移除。

避免：移除 beads 或将 beads 吸入枪头。

9. 清洗第一遍：保持样品仍然放置在10× Magnetic Separator high 上，向每个PCR管内加入 200μl 80% 乙醇，等待30s。
10. 吸去乙醇。
11. 清洗第二遍：保持样品仍然放置在10× Magnetic Separator high 上，向每个PCR管内加入 200μl 80% 乙醇，等待30s。
12. 吸去乙醇。
13. 将样品PCR管取出，快速离心，然后放在 10× Magnetic Separator low上。
14. 用 200μl 移液枪将样品管内残存的乙醇吸除，但不要使 beads 过干。
15. 将样品PCR管从 10× Magnetic Separator low 上取下，立刻向每管内加入 35.5μl EB。移液枪量程调制 30μl，每管样品吹打混匀 15 次，直到管内无块状物残留。
16. 在室温下静置 2min。
17. 将样品PCR管放在 10× Magnetic Separator low 上 2min，直到管内液体澄清。
18. 从每管中吸取 35μl 澄清液体，转移至写好标签的 0.6ml EP 管。
19. 样本可在 4°C 冰箱里储存 72h，或放在 -20°C 冰箱中长期储存。

若要送测序，则放在实验台冰箱下层 -20°C 暂存。

6.7 GEX Post Library Construction QC

【使用 Equalbit dsDNA HS Assay Kit 对样品进行浓度测定】

1. 按照 Equalbit Reagent 和 Equalbit Buffer 1:200 的比例配置工作液。
2. 配置标准品：准备好标有“1”和“2”的 0.6ml EP 管，每管加入 190μl 工作液，然后分别吸取 10μl Equalbit Standard # 1 和 Equalbit Standard # 2，加入管中。
3. 配置样品：准备好标有样品标签的 0.6ml EP 管，每管加入 199μl 工作液，然后分别吸取 1μl 样品溶液，加入管中。
4. 将按照以上步骤配置的标准品和样品涡旋震荡，然后避光反应 2min。
5. 通过 Qubit 荧光仪检测浓度。