

10×单细胞测序 V5-step3:DNA Amplification & QC

整理人：刘可钦

3.0 cDNA Amplification & QC

【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
cDNA Additive	-20°C冰箱下部中层试剂盒内	室温放置	220067	解冻，涡旋震荡，确认无沉淀，快速离心	-20°C存储
cDNA Primer Mix	-20°C冰箱下部中层试剂盒内	室温放置		解冻，涡旋震荡，确认无沉淀，快速离心	-20°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
Amplification Master Mix	-20°C冰箱下部中层试剂盒内	冰盒放置	220125	解冻，涡旋震荡，确认无沉淀，快速离心	-20°C存储
Equalbit dsDNA HS Assay Kit	实验台冰箱上层	室温放置	/	现用现配	4°C存储
Qiagen Bugger 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

注意，标注测量浓度的试剂盒

3.1 cDNA Amplification

1. 在冰上配置 cDNA Amplification mix，将 mix 涡旋震荡并快速离心。

	Nuclease-free water	Amplification Master Mix	cDNA Additive	cDNA Primer Mix	总体积
试剂编号	/	220125	220067	220106	/
1x(μl)	8	50	5	2	65
2x(μl)	17.6	110	11	4.4	143
3x(μl)	26.4	165	16.5	6.6	214.5
4x(μl)	35	220	22	9	286
5x(μl)	44	275	27.5	11	357.5
6x(μl)	52.8	330	33	13.2	429
7x(μl)	58.8	385	38.5	14.7	497
8x(μl)	70	440	44	18	572
9x(μl)	75.6	495	49.5	18.9	643.5
10x(μl)	88	550	55	22	715
11x(μl)	96.8	605	60.5	24.2	786.5
12x(μl)	105.6	660	66	26.4	858

- 向每管样品（35μl）中加入 65μl 的 cDNA Amplification mix。
- 将移液枪量程调至 90μl，吹打混匀 5 次；然后快速离心。
- 在 PCR仪 上选择【10x5amp】程序，将样品放入 PCR仪，然后开始程序。

热盖温度	反应容量	反应时间
105°C	100μl	25-50min
步骤	温度	时间
1	98°C	00:00:40
2	98°C	00:00:20
3	67°C	00:00:30
4	72°C	00:01:00
5	go to step2, see table below for total # of cycles	/
6	72°C	00:01:00
7	4°C	hold

附注：【cycle数的选择】

Targeted Cell Recovery	Primary Cells Total Cycles	Cell Lines Total Cycles
100-500	18	16
501-2000	16	14
2001-6000	14	12
6001-10000	13	11

注意：tageted cell 一般为 PBMC，故 cycle 数一般设置为 14，即总 PCR 反应时长约为 34min。

本步骤结束后可将样本储存于 4°C 冰箱中，保存 72h，以待进行下一步实验。

3.2 cDNA Cleanup-SPRIselect

1. 涡旋震荡 SPRIselect Reagent > 30s，使管内无块状沉淀，然后吸取 60μl SPRIselect Reagent(0.6x)，加入样本。再将移液枪量程调至 150μl，吹打混匀 15 次。
2. 样本在室温下静置 5min。

此时可以开始准备 80% 乙醇加样槽。可将适量 80% 乙醇倒入加样槽中，暂时不用时应将加样槽放在塑料袋中防止污染。

3. 放在 10× Magnetic Separator high 上，直到样本澄清。

需要：在 10× Magnetic Separator high 上放置 2min，使 beads 充分吸附在管壁上。

4. 移除上清。

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。

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。

10. 用 200μl 移液枪将样品管内残存的乙醇吸除，然后敞开管盖，在空气中晾干 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 Elution Solution I，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 45.5μl Buffer EB。
12. 移液枪量程调制 45μl，每管样品吹打混匀 15 次，直到管内无块状物残留。
13. 室温下静置 2min。

此时可开始准备新的PCR管，并写好标签。

14. 将样品PCR管放在 10× Magnetic Separator high 上 2min，直到管内液体澄清。
15. 从每管中吸取 45μl 澄清液体，转移至新管。
16. 此后可将样本在 4°C 冰箱中储存 72h，或在 -20°C 冰箱中储存 7d，然后进行下一步操作。

3.3 cDNA QC & Quantification

【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。

将每个样品的浓度记录在试验台的实验记录本上，作为 V5 step 6 的参考。