

10×单细胞测序 V5-step2: Post GEM-RT Cleanup

整理人：刘可钦

2.0 Post GEM-RT Cleanup

【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
Additive A	-20°C冰箱下部中层试剂盒内	室温放置	220074	解冻，涡旋震荡，确认无沉淀，快速离心	-20°C存储
Dynabeads MyOne SILANE	实验台冰箱上层	室温放置	2000048	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。	4°C存储
Buffer Sample Clean Up 1	-20°C冰箱下部中层试剂盒内	水浴加热至65°C	220020	在65°C水浴锅上温浴十分钟，确认无肉眼可见的结晶物，冷却至室温。	-20°C存储
Recovery Agent	实验台	室温放置	220016	/	室温存储
Qiagen Bugger EB	实验台	室温放置	/	/	室温存储
Bio-Rad 10% Tween 20	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

2.1 Post GEM-RT Cleanup-Dynabeads

1. 在室温下向每个样本中加入 125μl Recovery Agent，然后静置等待 2min。

需要：用移液枪头沿管壁旋转并缓慢滴加。

避免：震荡混匀或吹打混匀。

正确操作后的样品外观：



此时中可开始制备Dynabeads Cleanup Mix。

2. 用移液枪从底部缓慢吸除 125μl Recovery Agent。

注意：出现分层现象，上层为水状液体，下层为油状液体。

需要：将移液枪枪头伸入PCR管底部。

避免：吸入上层水状液体；使样品从PCR管内溢出。

正确操作后的样品外观：



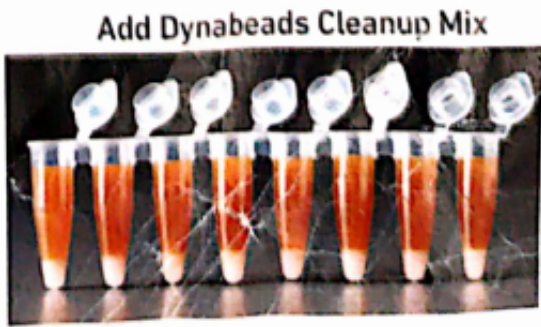
3. 配置 Dynabeads Cleanup Mix

	Nuclease-free water	Buffer Sample Clean Up 1	Dynabeads MyOne SILANE	Additive A	总体积
试剂编号	/	220020	2000048	220074	/
1x(μl)	5	182	8	5	200
2x(μl)	11	400.4	17.6	11	440
3x(μl)	16.5	600.6	16.4	16.5	660
4x(μl)	22	801	35	22	880
5x(μl)	27.5	1001	44	27.5	1100
6x(μl)	33	1201.2	52.8	33	1320
7x(μl)	38.5	1401.4	61.6	38.5	1540
8x(μl)	44	1602	70	44	1760
9x(μl)	49.5	1801.8	79.2	49.5	1980
10x(μl)	55	2002	88	55	2200
11x(μl)	60.5	2	96.8	60.5	1420
12x(μl)	66	2402.4	105.6	66	1640

4. 将 Dynabeads Cleanup Mix 涡旋震荡，向每管样品中加入 200μl，用 200μl 移液枪吹打混匀 5 次。

5. 在室温下静置 10min。

正确操作后的样品外观：



此时可以开始制备Elution Solution I，并准备 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。

6. 配置 Elution Solution I。

	Buffer EB	10% Tween 20	Additive A	总体积
试剂编号	/	/	220074	/
1x(μl)	98	1	1	100
2x(μl)	196	2	2	200
3x(μl)	294	3	3	300
4x(μl)	392	4	4	400
5x(μl)	490	5	5	500
6x(μl)	588	6	6	600
7x(μl)	686	7	7	700
8x(μl)	784	8	8	800
9x(μl)	882	9	9	900
10x(μl)	980	10	10	1000
11x(μl)	1078	11	11	1100
12x(μl)	1176	12	12	1200

7. 样品静置结束后，放置于 10× Magnetic Separator high 上，直到样本澄清。

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

注意：PCR管内的水油分层是正常现象。

8. 将PCR管内的液体移除。

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 300μl 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× Magnetic Separator high 上，向每个PCR管内加入 200μl 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× 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 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。

15. 将样品PCR管从 10× Magnetic Separator low 上取下，立刻向每管内加入 35.5μl Elution Solution I。

16. 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。

17. 室温下静置 1min。

此时可开始准备新的PCR管，并写好标签。

18. 将样品PCR管放在 10× Magnetic Separator low 上 2min，直到管内液体澄清。

19. 从每管中吸取 35μl 澄清液体，转移至新管。