



Smart-seq2原理

目录

背景
BACKGROUND

1

原理
PRINCIPLE

2

优缺点
PROS AND CONS

3



01

背景



Simone Picelli



Rickard Sandberg

背景介绍

Smart-seq是由路德维格癌症研究所的 Rickard Sandberg实验室所开发的一套在全转录组范围进行单细胞RNA测序 (scRNA-seq) 的方法。Smart-seq因为以全长mRNA建库，所以对转录本的测序覆盖度也有所上升。

Smart-seq2是由Picelli等人从Smart-seq中改良而来(Picelli et al., 2013) (Picelli et al., 2014)。



原理

Smart-seq: Switching mechanism at 5' end of the RNA template

1.单细胞分选（流式细胞仪）

2.细胞裂解（细胞裂解液）

3.反转录（一链合成）：Oligo(dT) 引物、鼠源的反转录酶(Moloney Murine Leukemia Virus, MMLV)

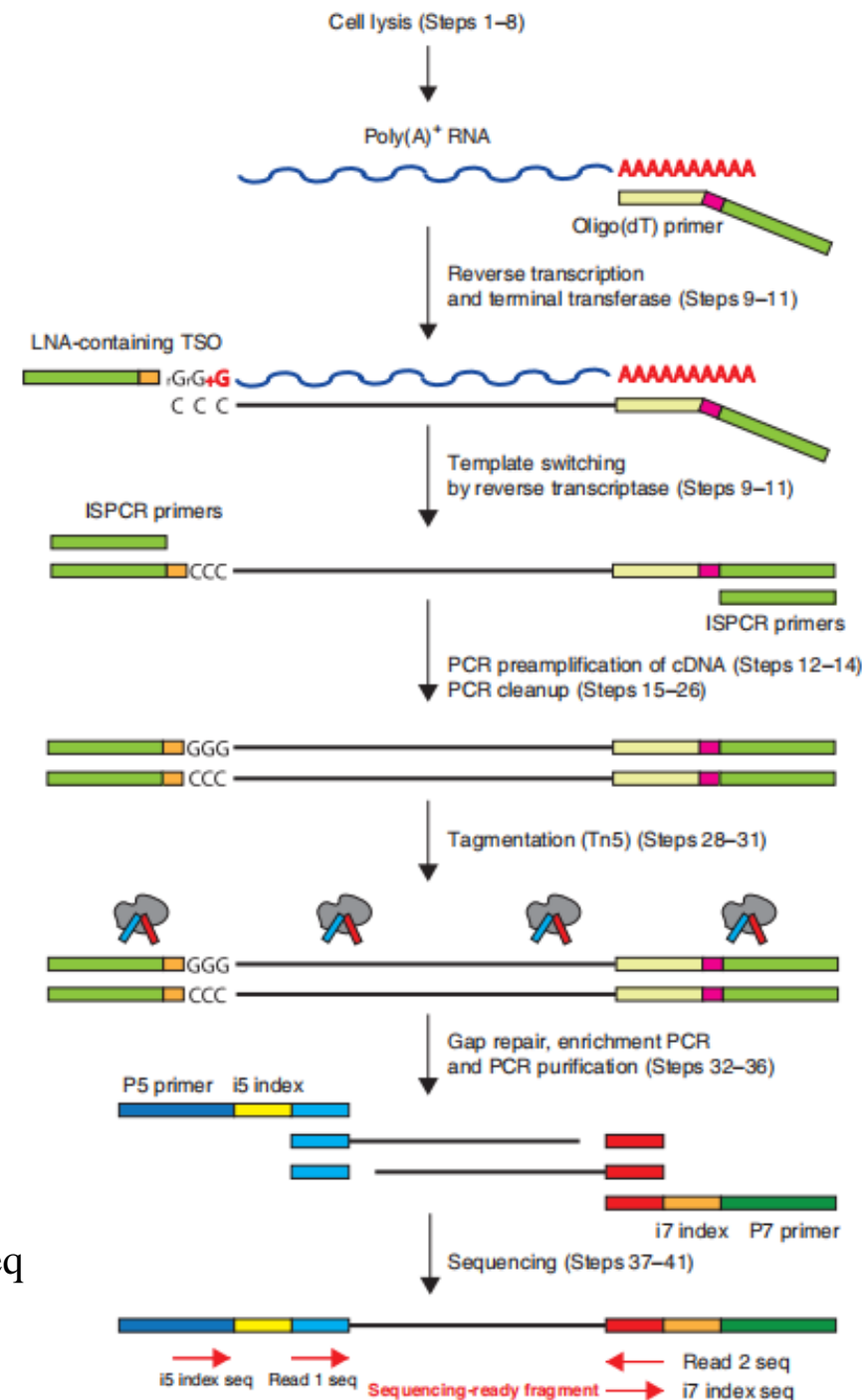
4.模板置换（二链合成）：TSO (template-switching oligo)

5.PCR扩增：扩增至ng级。

6.标记：Tn5转座酶，标记完成后在200-600bp

7.PCR富集&上机测序

Picelli S, Faridani OR, Björklund AK, Winberg G, Sagasser S, Sandberg R. Full-length RNA-seq from single cells using Smart-seq2. Nat Protoc. 2014 Jan;9(1):171-81. doi: 10.1038/nprot.2014.006. Epub 2014 Jan 2. PMID: 24385147.





优缺点

优点

不足

1.成本更低，与SMARTer相比，便宜了大约12%；可产生质量更高的文库；为分析大量细胞提供了可能性

2.MMLV逆转录酶倾向于选择全长cDNA作为其末端转移酶底物，因此每个转录本的所有外显子都能被检测到，可以用于检测可变剪接，还可以在转录本层面进行全面的SNP和突变分析，扩大了其应用范围



1.由于对聚腺苷酸化的RNA具有选择性，所以不能分析非poly(A)的RNA

2.测序reads不带有mRNA链特异性

1.TSO引物的3'末端有2个核糖鸟苷(rG)和一个LNA修饰的鸟苷(+G)，这样的设计使LNA单体的热稳定性增强，其退火温度增强非模板cDNA的3'延伸能力

2.甜菜碱（甲基供体：①会增加蛋白质的热稳定性②通过破坏DNA螺旋来降低碱基对DNA热融变的依赖性）

与较高的MgCl₂浓度结合使用。解决某些RNA形成二级结构（例如发夹或环）由于空间位阻，可能导致酶终止链延长的问题





THANK YOU