

单细胞 RNA 测序样品制备——甲醇固定化细胞 (Methanol Fixation)

配制 Buffer

- 1、Rehydration Buffer, 需要 10 ml: 1x DPBS (无钙酶离子的 PBS, 并添加 1% BSA 和 0.5 U/ml RNase Inhibitor)
- 2、将 100%的甲醇于-20℃预冷, 每个样品需要 2 ml 甲醇
- 3、将配制好的 1x DPBS 于 4℃预冷, 每个样品需要 5 ml 的 1x DPBS
- 4、配制 Sucrose Cushion Buffer I: 每个样品需要混合 700 μ l Nuclei PURE 2M Sucrose Cushion Solution with 100 μ l Nuclei PURE Sucrose Cushion Buffer

甲醇固定 (建议细胞起始量为 5×10^6 个)

- 1、2ml 离心管中加入 5×10^6 个细胞, 300 rcf 离心 3 分钟
- 2、离心后, 小心弃掉上清
- 3、用宽口枪头加入 1ml 预冷的 1xDPBS, 轻柔混合 10 次直到细胞完全均匀重悬
- 4、离心 300 rcf, 5 分钟, 4℃
- 5、重复步骤 2-4
- 6、小心弃掉上清
- 7、用宽口枪头加入 100 μ l 预冷的 1xDPBS, 轻柔混合 10 次直到细胞完全均匀重悬
- 8、加入 900 μ l 预冷 100%的甲醇, 注意缓慢一滴一滴加入, 边加边晃动离心管, 避免细胞结团
- 9、将细胞在冰上固定 15 分钟
- 10、固定后进行细胞计数
- 11、固定后的细胞可存放于 4℃、-20℃ 或 -80℃, 最多可存放 6 天

密度梯度离心 (如是组织解离得到的单细胞, 需要进行密度梯度离心去除污染及细胞碎片)

假定有 3×10^6 个甲醇固定的细胞, 固定的细胞如存放于-20℃ 或 -80℃, 应提前取出放置在冰上, 平衡至 4℃

- 1、离心 3000 rcf, 5 分钟, 4℃
- 2、离心后, 小心弃掉上清
- 3、用普通枪头加入 500 μ l 预冷的 Rehydration Buffer, 轻柔混合 5 次直到细胞完全均匀重悬
- 4、用普通枪头加入 900 μ l Sucrose Cushion Buffer I, 轻柔混合 10 次
- 5、制备蔗糖梯度, 在 2ml 离心管中加入 500 μ l Sucrose Cushion Buffer I
- 6、小心将步骤 3-4 得到的 1400 μ l 细胞悬液加到步骤 5 的 Sucrose Cushion Buffer I 上, 形成两层, 注意不要混合
- 7、离心 13000 g, 45 分钟, 4℃
- 8、小心弃掉上清, 剩余 100 μ l, 用普通枪头重悬细胞
- 9、用普通枪头加入 900 μ l 预冷的 Rehydration Buffer, 轻柔混合 10 次直到细胞完全均匀重悬
- 10、离心 3000 rcf, 5 分钟, 4℃
- 11、小心弃掉上清
- 12、用普通枪头加入 1000 μ l 预冷的 Rehydration Buffer, 轻柔混合 8-10 次直到细胞完全均匀重悬。如细胞起始量不同, 此时应调整 Rehydration Buffer 的加入量, 使细胞浓度达到 700-1200 cells/ μ l
- 13、立即开始 10x 单细胞实验

再水化 (Rehydration)

固定的细胞如存放于-20℃ 或 -80℃, 应提前取出放置在冰上, 平衡至 4℃

- 1、固定的细胞离心 3000 rcf, 10 分钟, 4℃

- 2、用宽口枪头加入 1000 μl 预冷的 Rehydration Buffer, 轻柔混合 10 次直到细胞完全均匀重悬
- 3、离心 3000 rcf , 10 分钟, 4 $^{\circ}\text{C}$
- 4、小心弃掉上清
- 5、重复步骤 2-4
- 6、用普通枪头加入 1000 μl 预冷的 Rehydration Buffer, 轻柔混合 8-10 次直到细胞完全均匀重悬。根据细胞起始量调整 Rehydration Buffer 的加入量, 使细胞浓度达到 700-1200 cells/ μl
- 7、立即开始 10x 单细胞实验