

TransNGS® Single Cell Full Length cDNA Synthesis & Amplification Kit

使用前请仔细阅读说明书
版本号: Version 2.0



目录号: KC901

保存: Single Cell TSO置于-70°C保存, 其余组分置于-20°C保存一年。

产品说明

TransNGS® Single Cell Full Length cDNA Synthesis&Amplification Kit是一款能够获得单细胞全长cDNA扩增产物的试剂盒, 适用于1-500个细胞或10 pg-10 ng总RNA的全长cDNA的扩增建库。该试剂盒以Single Cell Oligo (dT)为逆转录引物, 并应用合成效率高、且具有模板置换活性的逆转录酶在cDNA的3'端添加一段特殊序列, 从而得到全长cDNA产物。该试剂盒可兼容多种细胞和组织类型, 适用于RNA含量各异的细胞材料。一个单细胞文库通常可以获得10-60 ng的cDNA扩增产物。

特点

- 细胞类型兼容性强, 可适用于RNA含量较低的细胞 (如免疫细胞)。
- 组织类型兼容性强, 可适用于较难解离的组织 (如脑组织)。
- 单个细胞文库建库产量高, 峰型优异, 且有效检出基因 (FPKM>1) 的数目高。

适用范围

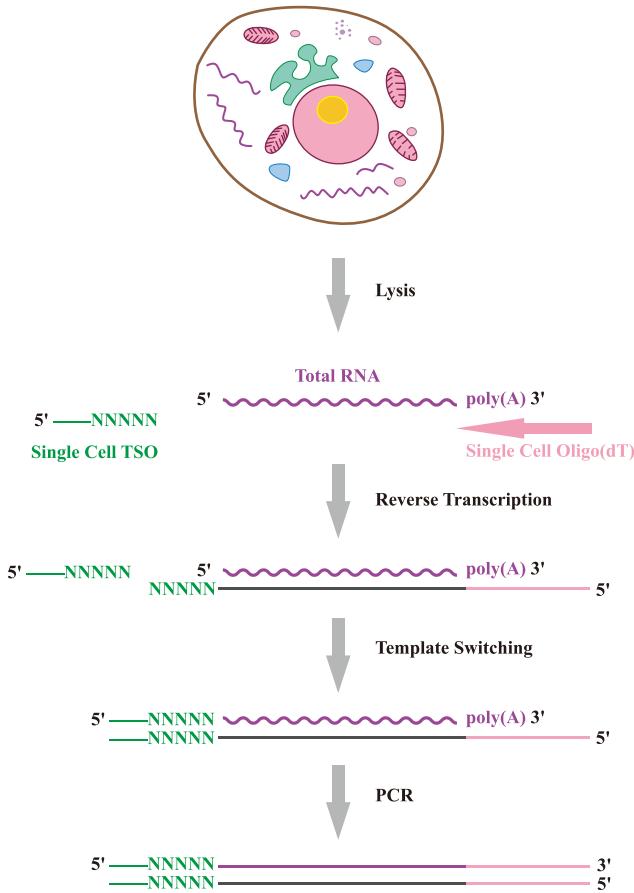
- 1-500个哺乳动物细胞或无细胞壁结构的真核细胞 (如原生质体)。
- 10 pg-10 ng总RNA (包含有poly(A)序列的mRNA)。

试剂盒组成

Component	KC901-01 (12 rxns)	KC901-02 (24 rxns)	KC901-03 (96 rxns)
● Single Cell Lysis Buffer	120 µl	240 µl	960 µl
● Single Cell Oligo(dT)	12 µl	24 µl	96 µl
● 10 mM dNTPs	12 µl	24 µl	96 µl
● Ribonuclease Inhibitors	24 µl	48 µl	192 µl
● Single Cell RT Buffer	24 µl	48 µl	192 µl
● DTT	12 µl	24 µl	96 µl
● Single Cell TSO	6 µl	12 µl	48 µl
● Single Cell RT Enhancer	6 µl	12 µl	48 µl
● Single Cell Reverse Transcriptase	12 µl	24 µl	96 µl
● 2×Single Cell Amplification SuperMix II	300 µl	600 µl	3×800 µl
● Single Cell PCR Primer	12 µl	24 µl	96 µl
○ RNase-free Water	1 ml	2 ml	5 ml
○ Library Elution Buffer	300 µl	600 µl	2.4 ml



实验原理示意图



推荐自备试剂

- *TransDetect*[®] Cell LIVE/DEAD Viability/Cytotoxicity Detection Kit (目录号: FC301)。
- *MagicPure*[®] Size Selection DNA Beads (目录号: EC401)。
- *TransNGS*[®] Tn5 DNA Library Prep Kit for Illumina[®] (for 1 ng DNA) (目录号: KP111)。
- *TransNGS*[®] Tn5 Index Kit for Illumina[®] (目录号: KI101)。
- 预冷1×PBS溶液, 新鲜配制的80%乙醇, 灭菌超纯水等。



起始样品准备

- **细胞样品准备:** 细胞收集后, 建议重悬于1×PBS中以去除培养基中的物质, 以免影响后续反应。细胞样品请用台盼蓝等方式鉴定活性; 待分选的细胞请用标记活度的流式染料标记后再分选(如推荐自备试剂中的FC301或自备钙黄绿素染料等), 染料标记之后请用PBS清洗并重悬细胞, 以免影响分选质量。细胞活力不高或是细胞环境不纯导致的RNA降解会使cDNA产量降低, 峰型偏小, 严重影响建库效果。
- **单细胞分选:** 将单细胞用流式分选等方式分选至已经加入裂解体系的反应孔中。分选完成后请尽早离心, 确保分选入孔的单细胞顺利进入裂解液中。因裂解液和单细胞本身自带的液体体积都很小, 立即离心可以避免入孔位置较偏的单细胞干涸在孔壁上, 从而提高建库的成功率。**单细胞分选自带的buffer体积可以忽略不计。**分选后的细胞样品可于低温条件下($<-70^{\circ}\text{C}$)保存, 干冰运输, 建议保存时间不超过半个月。
- **RNA样品准备:** 对于已提取的总RNA样品, 请用琼脂糖凝胶电泳或Agilent RNA 6000 Pico Kit等方式评价RNA完整性后再操作。RNA降解会导致cDNA产量降低, 峰型偏小, 严重影响建库效果。

操作步骤

1、细胞收集与裂解/RNA样品预处理 (于无菌条件下操作)

(1) 配制裂解 & RT预反应体系。

- 针对**1份样本**建库, 配制如下Preserving Buffer (总体积为**12 μl**):

Component	Volume
Single cell Lysis Buffer	10 μl
RNase Inhibitor	2 μl

将细胞/RNA样品按下表加入/分选至如下反应体系 (总体积为**2 μl**):

Component	Volume
Preserving Buffer	1.2 μl
细胞/RNA样品	$\leq 0.8 \mu\text{l}$
RNase-free Water	up to 2 μl

按下表配制退火反应体系 (总体积为**4 μl**):

Component	Volume
步骤(2) 细胞/RNA样品	2 μl
Single cell oligo(dT)	1 μl
dNTP Mix	1 μl

- 针对**N份样本**建库, 可直接配制**N+1份**裂解 & RT预反应体系:

Component	Volume
Single cell Lysis Buffer	1 $\mu\text{l} \times (\text{N}+1)$
RNase Inhibitor	0.2 $\mu\text{l} \times (\text{N}+1)$
Single cell oligo(dT)	1 $\mu\text{l} \times (\text{N}+1)$
dNTP Mix	1 $\mu\text{l} \times (\text{N}+1)$



将细胞/RNA样品按下表分别加入/分选至各份反应体系中（总体积为4 μl ）：

Component	Volume
裂解 & RT预反应体系	3.2 μl
细胞/RNA样品	$\leq 0.8 \mu\text{l}$
RNase-free Water	up to 4 μl

(2) 轻轻混匀样品，于PCR仪中72°C孵育3 min后，立即置于冰上孵育2 min。

2、cDNA第一链合成（于超净台中操作）

(1) 在样本冰浴过程中配制第一链cDNA合成Mix（总体积6 μl ），冰浴放置。

Component	Volume
Single Cell RT Buffer*	2 μl
DTT	1 μl
Single Cell TSO	0.5 μl
Single Cell RT Enhancer	0.5 μl
Single Cell Reverse Transcriptase	1 μl
RNase-free Water	1 μl

*Single Cell RT Buffer请于室温完全化冻，并充分涡旋混匀之后使用。

(2) 将上述6 μl 第一链cDNA合成Mix加至冰浴好的样品中，用移液器轻轻混匀后瞬时离心，总体积达10 μl 。

(3) 在PCR仪中运行如下程序（热盖85°C）。

Temperature	Time
42°C	90 min
70°C	15 min
4°C	Hold

3、全长cDNA扩增（于超净台中操作）

(1) 在冰上往反应完成的样品中加入以下体系，总体积50 μl 。

Component	Volume
2×Single Cell Amplification SuperMix II	25 μl
Single Cell PCR Primer	1 μl
RNase-free Water	14 μl

(2) 涡旋混匀样品，瞬时离心。在PCR仪中运行如下程序（热盖105°C）。



Temperature	Time	Cycle
98°C	3 min	1
98°C	15 sec	X*
67°C	20 sec	
72°C	3 min	
72°C	5 min	1
4°C	Hold	1

*推荐的扩增循环数如下表，可适当根据细胞类型的不同调整循环数。

细胞数	总RNA量	参考循环数
1 cell	10 pg	17-18
10 cells	100 pg	13-14
100 cells	1 ng	10-11
500 cells	10 ng	7-8

4、cDNA全长产物纯化

推荐使用0.6×*MagicPure*[®] Size Selection DNA Beads (目录号: EC401) 进行cDNA全长产物的纯化，具体操作如下：

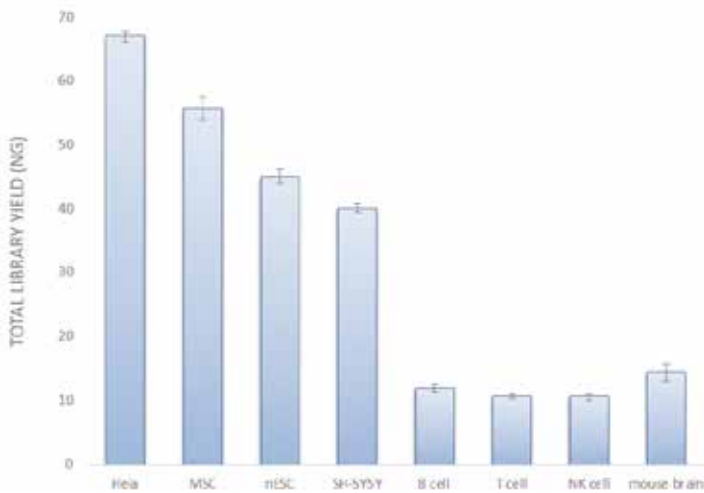
- 从2-8°C取出磁珠，室温静置30分钟后备用。
- 振荡磁珠使其充分混匀，吸取**30 μl**磁珠 (**0.6×**) 加入50 μl PCR产物中。
- 移液枪吹吸混匀，室温静置5分钟。
注意：混匀不充分会显著影响实验结果。
- 将PCR管置于磁力架上，室温静置至溶液澄清 (约5分钟)，使磁珠充分吸附在贴近磁力架的管壁上，弃上清。
注意：管壁上如有液体可点甩离心后置于磁力架上，务必使磁珠全部吸附在管壁上。切勿吸到磁珠，否则影响最终产量。
- 保持PCR管在磁力架上，向管中加入200 μl新鲜配制的80%乙醇，不要吹吸磁珠，室温静置30秒，弃上清。
注意：一定要使用新鲜配制的乙醇，否则会影响实验结果。
- 重复步骤(5)一次。
- 保持PCR管在磁力架上，室温晾干磁珠。
注意：切勿加热晾干，否则会影响最终产量。
- 将PCR管移出磁力架，加入22 μl Library Elution Buffer。移液枪吹吸混匀或涡旋混匀，室温静置3分钟。
- 将PCR管置于磁力架上，室温静置至溶液澄清 (约2分钟)，使磁珠充分吸附在贴近磁力架的管壁上。
注意：管壁上如有液体可点甩离心后置于磁力架上，室温静置可延长至5分钟。



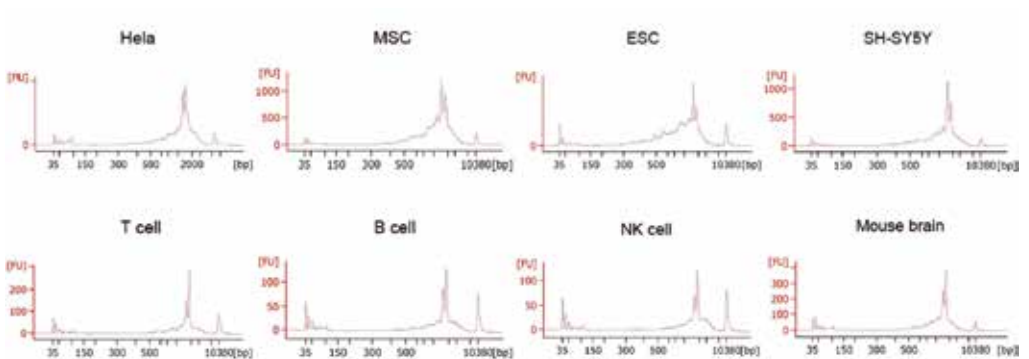
(10) 小心吸取20 μ l洗脱液转移至干净EP管中，进行产量和峰型的鉴定。

(11) 建议取1 ng纯化后的cDNA扩增产物制备Tn5测序文库，剩余的cDNA样本可以于-20°C长期保存。推荐 *TransNGS*[®] Tn5 DNA Library Prep Kit for Illumina[®] (for 1 ng DNA) (目录号: KP111) 以及 *TransNGS*[®] Tn5 Index Kit for Illumina[®] (目录号: KI101) 搭配使用。

附录



图一：各细胞类型的cDNA全长文库产出



图二：各细胞类型的cDNA全长文库峰型





品质高于一切
精品服务客户

本产品仅供研究，不用于临床诊断。

版本号: V2.0-202407

服务电话 +86-10-57815020

服务邮箱 complaints@transgen.com

Website www.transgen.com

E-mail trans@transgen.com

Customer Service +86-400-898-0321

Phone +86-10-57815030

