

TransNGS[®] Whole Transcriptome Amplification Kit 全长转录组扩增试剂盒

使用前请仔细阅读说明书

版本号: Version 1.0



目录号: KC921

保存: WTA TSO置于-70°C以下保存一年, 其余组分置于-18°C及其以下温度下保存一年。

产品说明

TransNGS® Whole Transcriptome 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1-10⁵个细胞或10 pg-100 ng总RNA的全长转录组的扩增建库。该试剂盒以WTA 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的全长转录组扩增产物。

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。
- 样本兼容体积高达6 μl, 可适配不同浓度RNA或不同数量细胞的扩增。

适用范围

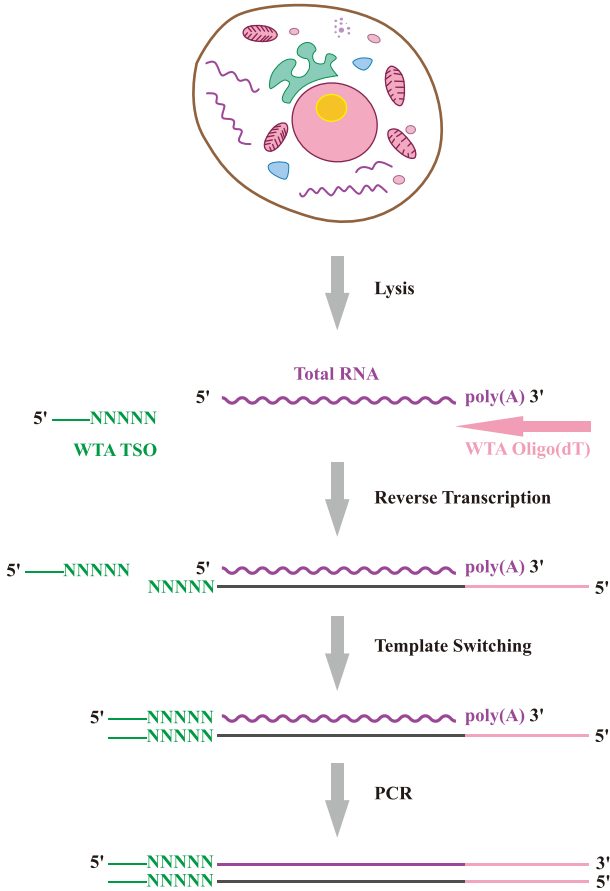
- 1-10⁵个哺乳动物细胞或无细胞壁结构的真核细胞(如原生质体)。
- 10 pg-100 ng总RNA(包含有poly(A)序列的mRNA)。

试剂盒组成

Component	KC921-01 (12 rxns)	KC921-02 (96 rxns)
WTA Lysis Buffer II	12 μl	96 μl
WTA Oligo(dT)	24 μl	192 μl
10 mM dNTPs	24 μl	192 μl
Ribonuclease Inhibitors	12 μl	96 μl
WTA RT Buffer	48 μl	384 μl
DTT	24 μl	192 μl
WTA TSO	12 μl	96 μl
WTA Reverse Transcriptase II	24 μl	192 μl
2×WTA Amplification SuperMix II	600 μl	4.8 ml
WTA PCR Primer	24 μl	192 μl
RNase-free Water	1 ml	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[®] (目录号: KP101/KP111/KP121)。
- *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°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) 对于**细胞**样品, 在冰上配制如下Preserving Buffer (6 μl):

Component	Volume
WTA Lysis Buffer II	1 μl
WTA Oligo(dT)	2 μl
10 mM dNTPs	2 μl
Ribonuclease Inhibitors	1 μl
Total volume	6 μl

然后往细胞溶液中加入上述反应体系, 总体积最终达11 μl:

Component	Volume
Preserving Buffer	6 μl
细胞样品	X μl
RNase-free Water	up to 11 μl
Total volume	11 μl

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。然后进入第2步cDNA第一链合成反应。

(2) 对于**RNA**样品, 在冰上配制如下Preserving Buffer (5 μl):

Component	Volume
WTA Oligo(dT)	2 μl
10 mM dNTPs	2 μl
Ribonuclease Inhibitors	1 μl
Total volume	5 μl



然后往RNA溶液中加入上述反应体系，总体积最终达**11 μ l**：

Component	Volume
Preserving Buffer	5 μ l
RNA样品	X μ l
RNase-free Water	up to 11 μ l
Total volume	11 μl

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。然后进入第2步cDNA第一链合成反应。

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一链cDNA合成Mix（总体积为**9 μ l**），冰浴放置。

Component	Volume
WTA RT Buffer*	4 μ l
DTT	2 μ l
WTA TSO	1 μ l
WTA Reverse Transcriptase II	2 μ l
Total volume	9 μl

*WTA RT Buffer请于室温完全化冻，并**充分涡旋混匀**之后使用。

(2) 将这9 μ l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**20 μ l**。

(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) 往反应完成的样品中冰上加入以下体系，根据PCR仪的样本容量*，可自行选择扩增体积。此处提供两种扩增体积对应的反应体系表。

扩增总体积为100 μ l的反应体系：

Component	Volume
上一步反应产物	20 μ l
2×WTA Amplification SuperMix II	50 μ l
WTA PCR Primer	2 μ l
RNase-free Water	28 μ l
Total volume	100 μl



扩增总体积为50 μ l的反应体系：

Component	Volume
上一步反应产物	20 μ l
2 \times WTA Amplification SuperMix II	25 μ l
WTA PCR Primer	1 μ l
RNase-free Water	4 μ l
Total volume	50 μl

* 请注意所使用PCR仪的样本容量，并自行检查。PCR仪金属孔应完全没过PCR管中的100 μ l液面方可使用100 μ l扩增体系，否则会因管内液体受热不充分而影响文库产量。如若PCR仪金属孔较浅，则推荐使用50 μ l扩增体系。

(2) 涡旋混匀样品，瞬时离心。在PCR仪中运行如下程序（热盖105 $^{\circ}$ C）。

Temperature	Time	Cycle
98 $^{\circ}$ C	3 min	1
98 $^{\circ}$ C	15 s	X*
67 $^{\circ}$ C	20 s	
72 $^{\circ}$ C	3 min	
72 $^{\circ}$ C	5 min	1
4 $^{\circ}$ 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
10 cells	100 pg	13-14
100 cells	1 ng	10-11
1000 cells	10 ng	7-8
10000 cells	100 ng	6-7

4. cDNA全长产物纯化

推荐使用0.6 \times 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：

- (1) 从2-8 $^{\circ}$ C取出磁珠，室温静置30分钟后备用。
- (2) 振荡磁珠使其充分混匀，吸取**60 μ l磁珠 (0.6 \times)**加入100 μ l PCR产物中，或吸取**30 μ l磁珠 (0.6 \times)**加入50 μ l PCR产物中。
- (3) 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。
- (4) 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。



(5) 保持PCR管在磁力架上，向管中加入200 μ l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。

(6) 重复步骤(5)一次。

(7) 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。

(8) 将PCR管移出磁力架，加入22 μ l RNase-free Water。移液枪吹吸混匀或涡旋混匀，室温静置3分钟。

(9) 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。剩余cDNA产物可以在-20 $^{\circ}$ C存放。

本产品仅供研究，不用于临床诊断。

版本号: V1.0-202409

服务电话 +86-10-57815020

服务邮箱 complaints@transgen.com

