天净沙系列

CAT#:220732

低温运输，-20℃保存

天净沙

单细胞 cDNA 扩增试剂盒（T7 IVT 法）

Single Cell cDNA Amplification Kit

使用手册 V0.5

北京天净沙基因科技有限公司

网址：www.tjs.bio；电话：400-1078566；电邮：order@tjs.bio

产品及特点

单细胞是非常重要的实验材料，但是由于单细胞中的 RNA 很少，平均只有约 10 pg 总 RNA，0.1 pg mRNA。但拷贝算，一个小鼠胚胎干细胞只有 2 万多个 mRNA 分子，一个小鼠成纤维细胞只有 50 万个 mRNA 分子。因此常常需要将其逆转录成 cDNA 后，对 cDNA 进行扩增，方便后续使用。扩增的方法主要有 PCR 和体外转录法。本产品是基于 T7 体外转录法开发的 cDNA 扩增试剂盒，它具有下列特点：

1. 一站式，即开即用，用户不用单独购买原料并进行优化。
2. 直接用 1-500 个真核细胞为起始材料，最后得到 cDNA 单链。本产品不适用于 mRNA 没有 polyA 尾巴的细胞，但可以定做本产品的改良型。
3. 基于 T7 IVT 线性扩增而非 PCR 扩增，避免了 PCR 扩增的偏向性。
4. 单链和双链 cDNA 合成一管完成，减少了多步操作。
5. 可以进行 1 次或多次扩增，每次扩增可以将拷贝数提升上万倍。
6. 基于磁珠法合成，可以反复使用至少 5 次，极大提高了效率。
7. 所得 cDNA 单链可以用于后续实验。如果加入自备的标记核苷酸，还可以进行单细胞 cDNA 标记，用于后续芯片杂交。
8. 提供可以 spike in 的阳性对照，方便检测各步效果。
9. 本产品足够进行 200 次 10 μL 体系单细胞逆转录反应和 10 μL 体系的 cDNA 扩增。本产品不含单细胞制备试剂盒。
10. 本产品只能用于科研。

规格及成分

本产品使用十一孔盒包装

成份	编号	规格	包装
RT-专用磁珠	220732	0.2 mL	0.5 mL 黄盖管
磁珠 RT 反应液 1	220732b1	0.5 mL	0.5 mL 白盖管
磁珠 RT 反应液 2	220732b1	0.5 mL	0.5 mL 绿盖管
磁珠 RT 专用酶	220725b3	100 μL	0.5 mL 红盖管
PC 冻干粉	220732c	5E4 拷贝	0.5 mL 紫盖管
模板稀释液	220732d	1 ml	1.5 mL 本色管
2×磁珠 IVT 反应液	220732e1	2 mL	2 mL 绿盖管
磁珠 IVT 酶	220732e2	0.2 mL	0.5 mL 红盖管

4×RT 反应液	220732h1	1 mL	1.5 mL 绿盖管
MMLV 酶	220732h2	200 μL	0.5 mL 红盖管
超纯水	220732	1 mL	1.5 mL 蓝盖管
使用手册	220725sc	1 份	无

以下成份用 5 孔盒包装，-20℃保存

成份	编号	规格	包装
2×Probe PCR Mix	220732h1	0.3 mL	0.5 mL 本色管
引物探针混合液	220732f2	30 μL	0.5 mL 棕色管

以下成份用塑料袋包装，常温度保存

成份	编号	规格	包装
磁珠 IVT 预洗液	220732f1	50 mL	60 mL 本色瓶
微量核酸沉淀剂	220732f2	15 mL	15 mL 本色瓶
8 孔磁力架	220732f2	1 个	-

运输及保存

低温运输，-20℃保存，有效期一年。

自备试剂

制备单细胞所需试剂，75%乙醇

使用方法

一、单细胞制备，本试剂盒不含相关试剂，下列操作步骤仅供参考。

1. 用户需要根据样本细胞种类选用合适的方法（如胰酶消化）制备单细胞悬液，使得每μL 悬浮液中平均有 1 个细胞。对已经处于单细胞悬浮状态的细胞（如卵细胞）并且浓度在 1 个细胞/μL 左右，则可以跳过此步。悬浮液必须使用 PBS，其他悬浮液可能跟本试剂盒不兼容，用前需要咨询本公司。

二、单细胞 cDNA 合成

2. 第一次使用本试剂盒时，需要制备 3 个浓度的阳性对照。在 2 个离心管中，分别标注 E2 和 E1，各加入 45 μL 模板稀释液。在试剂盒提供的 1E3 PC 冻干粉管中，加入 50 μL 模板稀释液，涡旋 2 分钟混匀，然后取 5 μL 到 E2 管中，涡旋 2 分钟混匀，然后取 5 μL 到 E2 管中，涡旋 2 分钟混匀，放冰上待用。未用完的必须放-80℃保存。阳性对照只在第一次使用本试剂盒或者分析原因时使用。
3. 在 0.2 mL 管中，设置如下反应。如果有 N 个样本，则设置 N+4 个反应管，

其中一个是阴性对照，三个是阳性对照。后面 4 个反应也可以不做。注意：加细胞悬液时最好使用显微操作系统，确保至少有 1 个细胞加入到管中，细胞数不要超过 500 个。

成份	NC 管	样本管	PC1 管	PC2 管	PC3 管
自备单细胞悬液	-	1 μL	-	-	-
1E7 RT 磁珠	1 μL	1 μL	1 μL	1 μL	1 μL
超纯水	1 μL				
1E1 PC（第 2 步）	-	-	1 μL	-	-
1E2 PC（第 2 步）			-	1 μL	-
1E3 PC（第 2 步）			-	-	1 μL
70℃1.5 分后速放冰上，然后加入					
磁珠 RT 反应液 1	2.5 μL	2.5 μL	2.5 μL	2.5 μL	2.5 μL
磁珠 RT 专用酶	0.5 μL	0.5 μL	0.5 μL	0.5 μL	0.5 μL
50℃保温 60 分钟，65℃保温 15 分钟。					
磁珠 RT 反应液 2	5 μL	5 μL	5 μL	5 μL	5 μL
37℃保温 10 分钟，95℃3 分钟，60℃3 分钟，75℃30 分钟。					

4. 所得产物为双链 cDNA。可以直接用于下一步实验，建议各取 1 μL NC 和 PC 管中样本到 9 μL 超纯水中，用户后续的扩增效率比较。

三、第一轮 cDNA 扩增

5. 用磁力架将磁珠吸附 1 分钟到管壁，吸走管底液体。
6. 加入 100 μL 磁珠 IVT 预洗液，轻柔重悬磁珠。
7. 用磁力架将磁珠吸附 1 分钟到管壁，吸走管底液体。立即进入下一步，避免磁珠干燥。
8. 将磁珠迅速悬浮在 10 μL 2×磁珠 IVT 反应液中，9 μL 超纯水，最后加入 1 μL 磁珠 IVT 酶。
9. 37℃保温 3 小时。
10. 用磁力架将磁珠吸附 1 分钟到管壁，将上清（含 mRNA）分别转移到 N+4 个新的离心管中进入下一步。迅速用 100 μL 磁珠 IVT 预洗液重悬磁珠，避免干燥，放冰上待用。如果长期不用请放 4℃保存。
11. 各加入 60 μL 微量核酸沉淀剂，吹打 10 次混匀后 14000g 离心 15 分，离

心前标注离心时的离心面。小心将上清转移到新离心管中（等实验结束，确保 RNA 回收后，再扔掉此上清）。

12. 在沉淀中加入 1 mL 自备的 75%乙醇，颠倒 10 次混匀，14000g 离心 3 分. 放入离心机时，确保离心面跟上步一致。
13. 小心移弃上清。
14. 短暂离心，小心移弃管底残留液体（约 50 μL）。
15. 加入 50 μL 超纯水溶解 mRNA 沉淀,取 1 μL 进行 Nano Drop 测定其浓度，计算 50 μL 中有多少μg mRNA。如果浓度非常低，请跟厂家联系。一般一个单细胞能得到 5 μg mRNA。
16. 确认得到 mRNA 后，按下表设置逆转录反应。每个样本最好设置 4 个独立的逆转反应重复，以便避免逆转录的偏差。下表是以一个样本为例：

成份	NC 管	重复 1	重复 2	重复 3	重复 4
mRNA（上步）	-	1 μg	1 μg	1 μg	1 μg
4×RT 反应液	5 μL	5 μL	5 μL	5 μL	5 μL
超纯水	1 μL	-	-	-	-
MMLV 酶	1 μL	1 μL	1 μL	1 μL	1 μL
补超纯水到	20 μL	20 μL	20 μL	20 μL	20 μL

17. 短暂离心，50℃保温 60 分钟，65℃保温 15 分钟。所得产物为 mRNA-cDNA 杂交链。如果需要去除 RNA，可以用自备的 RNase 酶降解。如果 RNA 不影响后续使用，建议以 RNA-DNA 杂交链的形式保存更好（否则单链 cDNA 容易自我形成区域杂交）。
18. 检测 cDNA 的扩增效率：各取 1 μL NC 和 PC 的扩增产物到 9 μL 超纯水中，和第 4 步留存的对照一起进行 PCR 扩增，检测模板的扩增倍数。在 PCR 管中，各加 5 μL 待测模板，10 μL 2×Probe PCR Mix，3 μL 引物探针混合液，2 μL 超纯水，进行 PCR。PCR 参数是 95℃ 3 分钟，(95℃ 30 秒，60℃15 秒，收集 FAM 通道的荧光信号，40 个循环)。NC 应该没有 Ct 或 Ct 大于 35,扩增后的样本的 Ct 应该比扩增前的大 12 以上（模板扩增了上万倍）。如果不符合，请跟厂家联系。

四、第二轮或更多轮 cDNA 扩增

19. 如果还要继续扩增 cDNA，则直接在第 10 步保留的磁珠重悬液中加入 1 μL 磁珠 IVT 专用 T7 RNA 聚合酶。此磁珠-cDNA 可以反复使用 5 次。

	20. 重复第 11 步到第 18 步的 cDNA 扩增及检测步骤。
关联产品	单细胞 RT 试剂盒