

Single Cell/Low Input cDNA Synthesis & Amplification Module

RK20310



使用说明书

Version: N17107v1.1

目录

| | |
|------------------|---|
| 1. 产品概述 | 1 |
| 2. 产品组分 | 1 |
| 3. 保存及运输条件 | 1 |
| 4. 其他自备材料 | 1 |
| 5. 实验流程 | 3 |
| 6. 操作注意事项 | 4 |
| 7. 操作步骤 | 5 |

1. 产品概述

- ◇ Single Cell/Low Input cDNA Synthesis & Amplification Module(ABclonal, Cat: RK20310) 能够以 1~1000 个单个细胞或者 10 pg~10 ng Total RNA 为模板进行全长 cDNA 的合成, 并实现全长 cDNA 的富集。相较于传统 RNA-Seq 方法, 本试剂盒可以兼容较低投入量样本, 解决了低 RNA 含量样本建库问题。
- ◇ 试剂盒采用优化后的 Oligo (dT) VN primer 为逆转录引物, 利用 Reverse Transcriptase 的 Template-switching 活性在 cDNA 3'末端添加接头序列, 最后以该接头序列为引物经 PCR 扩增完成双链全长 cDNA 的合成与富集, 获得的 cDNA 无 3'末端偏好性, 且 rRNA 残留率较低。
- ◇ 试剂盒中的每种试剂都经过了严格的质量控制, 且每一批次的试剂都经过了建库和上机测序的验证, 保证每一批次的试剂盒性能稳定。

2. 产品组分

| | 试剂管名称与颜色 | 24 RXN | 96 RXN |
|------|--|--------|---------|
| Box1 | ● Control Total RNA(1µg/µL) | 5 µL | 5 µL |
| | ● TSO Primer II | 48 µL | 192 µL |
| Box2 | ● Cell Lysis Buffer | 72 µL | 288 µL |
| | ● Oligo (dT) RT Primer | 24 µL | 96 µL |
| | ● dNTP Mix | 24 µL | 96 µL |
| | ● 5 X RT Buffer | 96 µL | 384 µL |
| | ● Reverse Transcriptase | 24 µL | 192 µL |
| | ● RNase Inhibitor | 48 µL | 192 µL |
| | ● PCR Primer | 24 µL | 96 µL |
| | ● 2X PCR Master Mix | 600 µL | 2400 µL |
| | ● Nuclease-free Water | 1 mL | 2 mL |
| | ● Low-EDTA TE | 1 mL | 2 mL |

● 代表管盖颜色。

3. 保存及运输条件

试剂盒长途运输: 尽量采用干冰运输, 或者干冰结合冰袋方式, 在 -40 ~ -20°C 温度条件下进行运输。

试剂盒保存: Box1 于 -80°C 保存, Box2 于 -20~-10°C 保存。

4. 其他自备材料

4.1. 建库试剂盒

One-step DNA Lib Prep Kit for Illumina V2 (1 ng Input DNA) (ABclonal, Cat: RK20237);

One-step DNA Lib Prep Kit for Illumina V2 (5ng Input DNA) (ABclonal, Cat: RK20238);

4.2. 建库接头

Dual DNA Adapter 96 Kit for One-step DNA Lib Prep (ABclonal, Cat: RK20290)。

4.3. 纯化磁珠

AFTMag NGS DNA Clean Beads (ABclonal, Cat.NO. RK20257), 或者其他具有相同性能的核酸纯化磁珠产品。

4.4. RNA 样本浓度和质量评估

Qubit 荧光定量仪

Qubit RNA HS Assay Kit (ThermoFisher SCIENTIFIC, Cat. Q32855);

Nanodrop ;

Agilent RNA 6000 Pico chip (Agilent #5067-1513)

4.5. 文库质控

Qubit 荧光定量仪;

ABQubit dsDNA Quantitation Kit (ABclonal, Cat. RK30140);

Agilent high sensitivity DNA Chips (Agilent #5067-4626);

Agilent DNA 1000 chip (Agilent #5067-1504);

4.6. 其他试剂与耗材

80%乙醇 (新鲜配制)、磁力架、PCR 仪等。

5. 实验流程

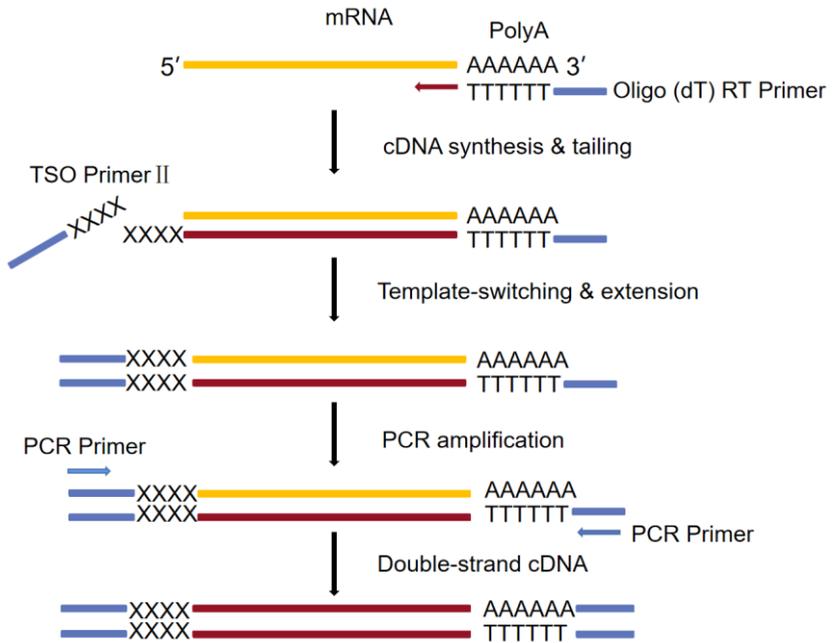


图1. 实验流程示意图

6. 操作注意事项

6.1. RNA样品质控

6.1.1. 样本投入量要求: 1~1000个细胞或者10 pg~10 ng Total RNA为起始量;

6.1.2. 样本类型要求: 含有polyA尾巴的真核细胞 (不含细胞壁结构) 或者抽提的Total RNA样本, 不适用于原核细胞或者固定过的细胞。

细胞样品: 由于细胞活性, 细胞周期等会影响cDNA产出, 建议在细胞分选之前进行细胞活性鉴定, 死细胞会发生RNA降解, 影响实验结果, 鉴定合格后立即进行细胞分选; 分选好的细胞如果不立即进行实验, 建议按照步骤7.1.3处理后, 立即放入-80℃冰箱储存, 取出后尽快进行反应; 细胞培养基, PBS等成分对反应有抑制作用, 请尽量缩减这些成分的体积。

RNA样品: 实验开始前建议使用Agilent RNA 6000 Pico Kit评估样本完整性, 对于降解的样本会影响cDNA的产出和长度分析, 有可能造成实验的失败。

6.1.3. 不同样本中mRNA含量不同, 对于mRNA较少样本, 建议适当提高循环数, 防止cDNA合成浓度较低, 造成实验的失败。

6.2. 磁珠使用原则

6.2.1. 磁珠在使用前请提前半小时拿出, 放置于室温平衡。

6.3. 磁珠纯化过程中, 必须待酒精完全挥发后再加入Low EDTA TE 洗脱, 即磁珠颜色从光亮褐色变为磨砂褐色, 酒精未挥发完全或者磁珠过分干燥 (变龟裂) 均会影响文库产量。

6.4. 磁珠纯化过程中, 吸取上清时, 要小心操作, 避免吸到磁珠, 影响文库片段大小及产量。

6.5. 文库质控

6.5.1. cDNA实际产率取决于细胞的质量、数量以及mRNA含量。请根据第7.2.1步中提供的PCR循环数建议进行实验, 通常cDNA产量范围在4-20ng之间。

6.5.2. 制备好的cDNA使用Agilent high sensitivity DNA Chips (Agilent #5067-4626)进行cDNA长度评估, 全长cDNA主峰平均长度在1500-2000bp左右, 峰型范围在400-10000bp左右; 没有明显的二聚体残留即可判定cDNA合成合格。

6.6. 操作规范

6.6.1. 所有的缓冲液和酶应一直置于冰上。

6.6.2. 使用各类试剂时应小心, 避免试剂与样本间的交叉污染。

6.6.3. 实验过程中应配戴口罩, 手套, RNA样本稀释后冰上放置, 并尽快进入下一步实验, 避免RNA发生降解。

6.6.4. 本产品组分和流程已做最佳优化, 请勿更改。

6.6.5. 因为储存和运输过程中, RNA样本浓度可能会发生变化, 建议10倍稀释后先进行Qubit定量, 按照实测浓度进行实验。

7. 操作步骤

7.1. First Strand cDNA 合成

7.1.1. 提前将 Cell Lysis Buffer、Oligo (dT) RT Primer、dNTP Mix、5X RT Buffer、Nuclease-free Water 组分从-20°C 冰箱取出，放置于冰上溶解，待组分充分溶解后震荡混匀并短暂离心后置于冰上。

7.1.2. 按照下表体系配置 Lysis Mix:

| 试剂 | 体积 |
|--------------------|-----------------------------------|
| Cell Lysis Buffer | 3 μL |
| RNase Inhibitor | 1 μL |
| Total volum | 4 μL |

注: Lysis Mix 现配现用，配置好未用完的 Mix 可以置于-20°C，并于 24 h 内用于后续反应。

7.1.3. 使用移液器吹打混匀，瞬时离心，将体系置于 PCR 仪（热盖温度 105°C）：

7.1.4. 样品准备：

按照下表设置对照和待测样品，配置如下反应体系：

| 试剂 | 阴性对照 | 阳性对照 | 待测样品 |
|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| Lysis Mix | 4 μL | 4 μL | 4 μL |
| Control Total RNA | - | 1~6 μL | - |
| Total RNA/cell | - | - | 1~6 μL |
| Nuclease-free Water | To 10 μL | To 10 μL | To 10 μL |

注 1. 此处 Control RNA 浓度为 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ，使用时用 Nuclease-free Water 梯度稀释至所需浓度。

注 2: 若为 RNA 样本，取 10 pg ~10 ng RNA 至 Lysis Mix 管中，若 RNA 样本体积不足 6 μL 时，使用 Nuclease-free Water 补足至总体积 10 μL ；

注 3: 若为细胞样本，取 1~1000 个分离的细胞至 Lysis Mix 管中，体积不足 6 μL 时，使用 Nuclease-free Water 补足至总体积 10 μL ，移液枪吹打混匀后，短暂离心，室温孵育 5 min；

注 4. 此处分离的细胞中，细胞培养基和 PBS 等成分可能对反应有抑制作用，请尽量减少这些成分的体积，防止可能带来的影响；如果细胞需储存一定时间后再进行扩增，此步制备好的细胞样品可于-80°C 保存。如需运输，请使用干冰运输；

7.1.5. 样品至于冰上，按照下表配置退火体系：

| 试剂 | 体积 |
|----------------------|------------------------------------|
| 步骤 7.1.4 样品 | 10 μL |
| Oligo (dT) RT Primer | 1 μL |
| dNTP Mix | 1 μL |
| Total volum | 12 μL |

7.1.6. 用移液器轻轻吹打混匀，短暂离心后置于冰上放置。

7.1.7. 在 PCR 仪中按照以下反应程序运行（热盖 105°C）：

| 温度 | 时间 |
|--------------|-------|
| 72°C | 5 min |
| 反应结束后立即放置冰上* | 2 min |

注：反应结束后立即至于冰上放置至少 2 min。

7.1.8. 按照下表配置逆转录反应体系：

| 试剂 | 体积 |
|-----------------------|-----------------------------|
| 步骤 7.1.7 产物 | 12 μ L |
| 5X RT Buffer | 4 μ L |
| TSO Primer II | 2 μ L |
| RNase Inhibitor | 1 μ L |
| Reverse Transcriptase | 1 μ L |
| Total volum | 20 μL |

注：使用移液器轻轻吹打混匀，短暂离心后立即置于 PCR 仪中。

7.1.9. PCR 运行程序如下（热盖 105°C）：

| 温度 | 时间 |
|------|--------|
| 42°C | 90 min |
| 70°C | 10 min |
| 12°C | Hold |

7.2. 全长 cDNA 扩增

7.2.1. 提前将 2X PCR Master Mix 和 PCR Primer 取出，置于冰上溶解，待溶解后充分混匀至于冰上备用。按照下表配置

PCR 反应体系：

| 试剂 | 体积 |
|---------------------|-----------------------------|
| 步骤 7.1.9 反应产物 | 20 μ L |
| 2X PCR Master Mix | 25 μ L |
| PCR Primer | 1 μ L |
| Nuclease-free Water | 4 μ L |
| Total volum | 50 μL |

7.2.2. 用移液器轻轻吹打混匀，短暂离心后置于冰上放置。

7.2.3. PCR 运行程序如下：

| 温度 | 时间 | 循环数 |
|------|--------|-------------|
| 98°C | 1 min | 1 cycle |
| 98°C | 10 sec | |
| 67°C | 15 sec | 8~18 cycles |
| 72°C | 3 min | |
| 72°C | 5 min | 1 cycle |
| 12°C | Hold | |

循环数推荐如下：

| Input Total RNA | Input cells | Cycles |
|-----------------|-------------|--------|
| 10 ng | 1000 cells | 8-9 |
| 1 ng | 100 cells | 11-12 |
| 100 pg | 10 cells | 14-15 |
| 10 pg | 1 cell | 17-18 |

注：上表推荐循环数是以 293T 细胞/HeLa 细胞为模板得到的参考数据。在以单细胞为起始模板的扩增反应中，不同的细胞 RNA 含量差别较大，因此 PCR 循环数存在较大的变动，请根据样品酌情增减扩增循环数，首次测试一种细胞时，我们建议测定 PCR 循环数。

7.2.4. 反应结束后，将上述产物从 PCR 中取出置于冰上放置，立即进行 7.3 全长 cDNA 扩增产物纯化从操作。若需 4°C 过夜储存，放置时间请勿超过 12h。

7.3. 全长 cDNA 扩增产物纯化

7.3.1. 提前将 AFTMag NGS DNA Clean Beads 从 2-8°C 取出，静置平衡至室温，使用前涡旋或者振荡混匀；

7.3.2. 将上述 7.2.4 反应管中加入 30 μ L AFTMag NGS DNA Clean Beads (0.6X)，吹打混匀；

7.3.3. 室温静置 8 min，使 cDNA 充分结合到磁珠上；

7.3.4. 将 PCR 管短暂离心收集后转移至磁力架上~5 min，直至溶液变澄清，小心弃除全部上清；

7.3.5. 将离心管保持在磁力架上，加入 200 μ L 80%乙醇，静置 30 s，小心弃除全部上清；

7.3.6. 重复 7.3.5，将磁珠用 200 μ L 80%乙醇再漂洗 1 次；

7.3.7. 保持 PCR 管置于磁力架上，用 10 μ L 移液器将残留液体彻底吸干；

7.3.8. 干燥磁珠 1-2 min，待酒精挥发完全后（磁珠颜色从光亮褐色变为磨砂褐色），将 PCR 管从磁力架上取下，加入 17 μ L Nuclease-free Water，使用移液器吹打混匀；

7.3.9. 室温静置 2 min。如果磁珠干燥开裂，应适当延长孵育时间；

7.3.10. 将 PCR 管短暂离心后置于磁力架上 1 min，直到溶液变澄清，小心吸取 16 μ L 上清至另一新的离心管中，-20°C 留存备用。

7.4. 全长 cDNA 扩增产物检测

一般情况下，根据起始模板的量不同，成功的 cDNA 产物产量应在 4~20ng 之间，全长 cDNA 峰型范围在 400-10000bp

之间,主峰平均长度在 1500-2000bp 左右;无模板阴性对照没有产物(如图 2 所示)。推荐使用 Agilent 2100 Bioanalyzer 进行检测,参照 High Sensitivity DNA Chip 操作手册,取 1 μ L 纯化后的 cDNA 产物于 DNA High Sensitivity Chip 完成检测。

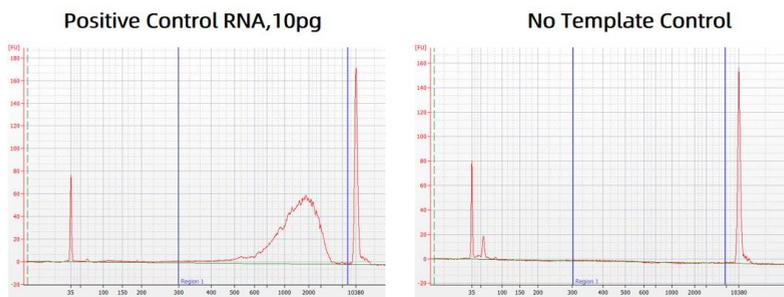


图2. 全长cDNA片段分析图

7.5. Illumina 平台文库制备

推荐使用 1ng 全长 cDNA 扩增产物通过 One-step DNA Lib Prep Kit for Illumina V2 (1 ng Input DNA) (ABclonal, Cat: RK20237)制备 cDNA 测序文库,实验操作可参看对应说明书。

武汉爱博泰克生物科技有限公司

电话：400-999-6126

邮箱：cn.market@abclonal.com

网址：www.abclonal.com.cn

地址：湖北省武汉市江夏区东湖高新区高科园 3 路精准医疗产业基地项目一期 5 号楼