

MALBAC®白金微量 RNA 扩增试剂盒

【产品编号】

KT110700724

KT110700796

【产品名称】

通用名：MALBAC® 白金微量 RNA 扩增试剂盒

英文名：MALBAC® Platinum Single Cell RNA Amplification Kit

【包装规格】

24 测试/盒，

96 测试/盒

【产品描述】

MALBAC® 白金微量 RNA 扩增试剂盒能在 5-6 小时内，由 1-2000 个细胞或 10 pg-20 ng 经提取的真核生物总 RNA 为起始，特异性针对其中的 mRNA 进行逆转录，并以 MALBAC® Template-switching 专利技术在 cDNA 的 3'端添加一段带有表达定量分子标签的接头序列，通过该接头序列进行后续的 PCR 扩增，获得全长 cDNA 扩增产物，有效避免了 cDNA 合成过程中的 3'偏好性和基因组 DNA 与 rRNA 的污染，同时表达定量分子标签可辅助基因表达量计算，在完整扩增 mRNA 序列信息的同时保留链来源信息，对基因表达进行精确定量。一般情况下，一个反应视投入量可以扩增出 2-50 ng 高质量全长双链 cDNA。

本试剂盒可获得 95%以上的逆转录与扩增成功率，全长 cDNA 扩增产物可无缝衔接主流测序平台，如 Illumina、Ion torrent、PGM、Ion Proton 测序仪，下机数据（2.5M Reads）可检测到 90%以上的基因表达，基因表达一致性超过 90%，扩增无明显偏倚，且需要的样本投入量更少。

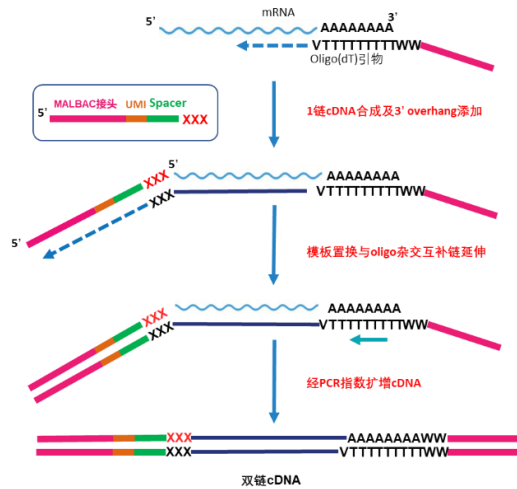
【预期用途】

本产品主要用于单细胞 RNA-Seq 前的样本扩增。单细胞 RNA-Seq 是指通过对单个细胞的 mRNA 进行逆转录和 PCR 扩增，使用高通量测序手段，对单细胞中 mRNA 进行基因表达定量、功能富集、代谢通路等分析。本产品可以解决传统 RNA 逆转录与扩增技术在早期胚胎发育、干细胞、癌症、免疫等研究领域中的样品量极低或细胞异质性的问题，是在单细胞水平研究基因表达强有力的工具，极大地拓展了 RNA-Seq 的应用范围：

- 极微量样品的表达分析（单个细胞）
- 胚胎早期发育研究
- 肿瘤细胞异质性研究
- 免疫细胞群研究
- 干细胞分化研究



【产品原理】



扩增原理图

本产品可实现高效且均一的全长转录本扩增。单细胞（或极微量细胞）经热裂解后释放总 RNA，在逆转录酶的作用下对其中 mRNA 进行逆转录并获得 cDNA 第一链，而后以 MALBAC® Template-switching 专利技术在 cDNA 的 3'端添加一段接头序列，并进行 Template-switching，而后以接头区段为引物锚定位点进行指数扩增，以获得符合下游分析或文库构建要求的高质量全长 cDNA。其核心技术为专利的 MALBAC® Template-switching 技术，能完整扩增 mRNA 全长序列，同时为单细胞中每个转录本标记特异性分子标签（UMI），保留链来源信息，实现了单细胞水平上转录本的绝对定量（需使用打断方法构建文库），为 RNA-Seq 下游实验或分析提供充足的材料。

【主要组成成分】

| 组分 | 标签名 | KT110700724 (24 反应) | KT110700796 (96 反应) |
|---------|-----------------------------|------------------------|------------------------|
| 细胞裂解液 | Cell Lysis Buffer | 36 μL/管×1管 | 144 μL/管×1管 |
| 逆转录缓冲液 | RT Buffer | 319.2 μL/管×1管 | 1276.8 μL/管×1管 |
| 逆转录酶混合液 | RT Enzyme Mix | 40.8 μL/管×1管 | 163.2 μL/管×1管 |
| 指数扩增反应液 | PCR Mix | 720 μL/管×1管 | 1440 μL/管×2管 |
| 无RNA酶水 | RNase Free H ₂ O | 1mL/管×1管 | 1mL/管×1管 |

【储存条件及有效期】

-20℃ 保存，有效期：24 个月。如需多次使用，可依据需求按比例分装冻存，避免反复冻融。

【自备物品】

1. 试剂：1×PBS 缓冲液；
2. 仪器：离心机、涡旋混匀仪、PCR 仪、单细胞分选相关仪器。

【产品特点】

- 极低起始量：单个细胞（或 10pg total RNA）；
- 极高效率：mRNA 逆转录与扩增后可获得 2-50 ng 高质量全长 cDNA；
- 操作简单：单管操作，3 步完成、实验流程仅需 5-6 小时即可完成。



【适用领域】

本试剂盒可解决传统 RNA 逆转录与扩增技术在早期胚胎发育、干细胞、癌症、免疫等研究领域中的样品量极低或细胞异质性的问题。

【样本要求】

1. 样本起始量

本试剂盒是针对单细胞或极微量细胞的转录组扩增设计的，使用 Oligo dT Primer 扩增带 polyA 序列的 RNA。兼容多种样品类型：1-2000 个哺乳动物细胞，或其他无细胞壁结构的真核细胞；10 pg-20 ng 纯化后的总 RNA（注意，如以微量 RNA 为起始，强烈建议在试剂盒中无 RNA 酶水中 49: 1 掺入 RNase Inhibitor，配置成 Mix，作为 RNA 稀释 Buffer）；不适用于原核细胞；不适用于固定后的细胞。

2. 样本收集方式

FACS 分选、激光捕获显微切割（LCM）、针吸活检、微流体技术方式获得的单细胞均可利用本试剂盒进行转录组扩增。

3. 样本预处理

由于细胞的基因表达是瞬时变化的，细胞类型、细胞活性及细胞所处周期的不同，都会显著影响最终的 cDNA 产出。请确定细胞的获取方式对细胞活性的影响，我们建议在每次收集完细胞样品后对细胞活性进行鉴定，死亡的细胞会发生明显的 RNA 降解并导致反应失败。鉴定合格后建议立即进行反应，不适当的保存条件会导致细胞中的 RNA 降解。为避免细胞准备过程中外源 RNA 的污染，建议在实验前对细胞进行清洗，清洗液为不含 Mg^{2+} 和 Ca^{2+} 的无菌 1×PBS 溶液。

【实验准备】

1. 预扩增样本准备区的隔离

为避免样本受外界因素干扰或 RNA 酶的污染，在实验前，细胞样本的准备过程需在单独隔离的实验室或专门工作区完成，并预备专用的实验材料和仪器，例如，移液器、移液管、PCR 管、1.5 mL 的离心管、离心管架、离心机、漩涡混和仪和实验服等；

请将扩增产物与试剂盒中其他试剂分开储存。所有的下游分析处理，如 DNA 纯化、测序前的准备工作，请在另一实验室进行。

2. 对照组 DNA 样本

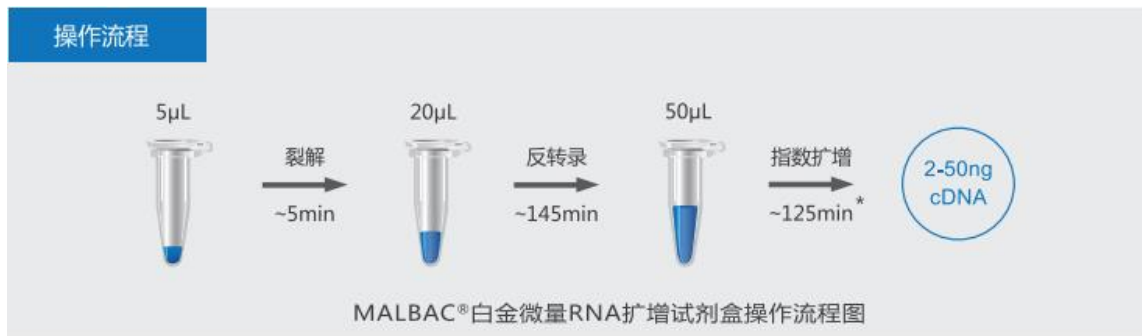
阳性对照配置：如以细胞为起始，可将同批（处理方式相同）的约 100 个细胞作为阳性对照；如以核酸为起始，可用同批（处理方式相同）的 1 ng 总 RNA 为阳性对照。

阴性对照配置：取 3.5 μ L 无 RNA 酶水，加入到含 1.5 μ L Cell Lysis Buffer 的 PCR 管中，作为阴性对照。



【使用方法】

操作流程概要



步骤一

1. 将单细胞加入裂解液中
2. 在PCR仪中进行裂解反应

步骤二

1. 将反转录酶混合物加入裂解产物中
2. 在PCR仪中进行反转录反应

步骤三

1. 将指数扩增混合物加入预扩增产物中
2. 在PCR仪中进行全扩增反应

*由于不同的细胞 RNA 含量存在较大差别，请根据样品酌情增减扩增循环数，首次测试一种细胞时，我们强烈建议设置循环数梯度，确定最佳循环数。

详细操作流程

注意：由于单细胞转录组扩增实验全程在同一 PCR 管中进行且裂解反应体积较小，因此加液操作时，移液器吸头不要接触管中液体，避免将单细胞或核酸裹挟出反应体系；移液时请沿管壁小心添加，勿剧烈吹打以免产生气泡；反应前请进行短暂离心（掌上离心机，3-4 秒），确保反应体系中的液体和模板混合充分。使用前请将含酶的组分置于冰浴中，无酶组分可在用前置于冰上解冻。

步骤一：获取单细胞（或微量细胞）及细胞裂解

1. 细胞稀释：将细胞用 1x PBS 缓冲液（以下 PBS 均指 1x PBS 缓冲液）稀释，离心、重悬，处理为细胞悬液，密度为~20 个细胞/ μ L；
 - a. 组织处理方法：将组织在液氮中磨碎，每 20-30 mg 组织加约 600 μ L PBS，12,000 rpm (~13,400 \times g)离心 1 分钟，得到细胞沉淀，弃上清并吸取细胞沉淀，用 1x PBS 稀释处理成细胞悬液；
 - b. 单层培养细胞处理方法：以 P1000 移液器将贴壁细胞轻轻吹下，12,000rpm (~13,400 \times g)离心 1 分钟，得到细胞沉淀，弃上清并吸取细胞沉淀，以 1xPBS 稀释处理成细胞悬液；
 - c. 细胞悬液处理方法：12,000rpm (~13,400 \times g)离心 1 分钟，得到细胞沉淀，弃上清并吸取细胞沉淀，用 1xPBS 稀释处理成细胞悬液。

注意：尽量除尽细胞培养基，细胞培养基可能抑制细胞裂解并影响 RNA 质量。

尽量使细胞充分悬浮并计数，计数不准确可能影响单细胞分离。

2. 细胞裂解：将单细胞加入含有 1.5 μ L Cell Lysis Buffer 的 PCR 管中；
注意：含有单细胞样本的 PBS 溶液体积不得超过 3.5 μ L，严格的体积控制（5 μ L，如不足请以无 RNA 酶水补齐）有助于逆转录反应的顺利进行。
3. 将 13.3 μ L 的 RT Buffer 置于新的 PCR 管中；
4. 在预热的 PCR 仪中孵育样本和 RT Buffer（RT Buffer 中千万不可加逆转录酶），条件如下：

| 温度 | 时间 |
|---------------------|-------|
| 72 $^{\circ}$ C | 3 min |
| 立即置于 0 $^{\circ}$ C | 2 min |



步骤二：逆转录获得双链全长 cDNA

1. 吸取 1.7 μL 的 RT Enzyme Mix 加入到上一步 72 $^{\circ}\text{C}$ 处理后的 RT Buffer 中，标记为“RT Mix”，手动混匀，离心；
2. 在每份细胞裂解产物中，加入 15 μL “RT Mix”，瞬时离心后立即置于冰上，在预热的 PCR 仪上孵育样本，条件如下：

| 温度 | 时间 | 循环 |
|-----------------------|---------|----|
| 42 $^{\circ}\text{C}$ | 90 min | 1 |
| 50 $^{\circ}\text{C}$ | 2 min | 10 |
| 42 $^{\circ}\text{C}$ | 2 min | |
| 70 $^{\circ}\text{C}$ | 15 min | 1 |
| 12 $^{\circ}\text{C}$ | Forever | |

步骤三：指数式扩增反应

1. 将 30 μL PCR Mix 加入到上一步的逆转录产物中（此时溶液体积为 50 μL ），混匀后放入 PCR 仪中扩增，反应条件如下：

| 温度 | 时间 | 循环 |
|-----------------------|---------|-----|
| 98 $^{\circ}\text{C}$ | 3 min | 1 |
| 98 $^{\circ}\text{C}$ | 20 s | 18* |
| 68 $^{\circ}\text{C}$ | 15 s | |
| 72 $^{\circ}\text{C}$ | 6 min | |
| 72 $^{\circ}\text{C}$ | 5 min | 1 |
| 12 $^{\circ}\text{C}$ | Forever | |

扩增循环数参考：

| 总 RNA | 细胞 | 参考循环数 |
|----------|-----------|-------|
| 10-20 ng | 1000-2000 | 7-8 |
| 1 ng | 100 | 11-12 |
| 100 pg | 10 | 14-15 |
| 10 pg | 1 | 17-18 |

注：上表参考循环数是以 GM12878 细胞为测试样本得到的参考数据。由于不同的细胞 RNA 含量存在较大差别，请根据样品酌情增减扩增循环数，首次测试一种细胞时，我们强烈建议设置循环数梯度，确定最佳循环数。

步骤四：产物纯化

本试剂盒使用的逆转录酶保护系统能使逆转录酶稳定地进行工作，但会使常规纯化磁珠结块，如直接使用磁珠纯化，会影响纯化质量，我们推荐以下两种纯化方式结合使用：

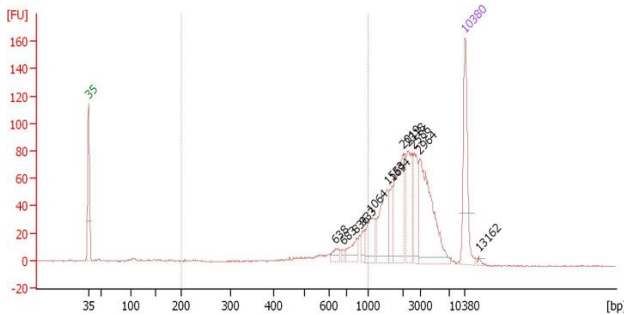
首先使用柱纯化去除逆转录酶保护系统：推荐产品为 DNA Clean & Concentrator™-5（货号：D4013）或其他等效产品（需自行测试），产物回溶于 50 μL Elution Buffer 中；

而后使用磁珠纯化进行小片段去除：在上步得到的 50 μL 产物中加入 Agencourt AMPure XP beads（货号：A63881）或其他等效产品（需自行测试），酒精清洗后，磁珠回溶于 17.5 μL Elution buffer，取 15 μL 储存。

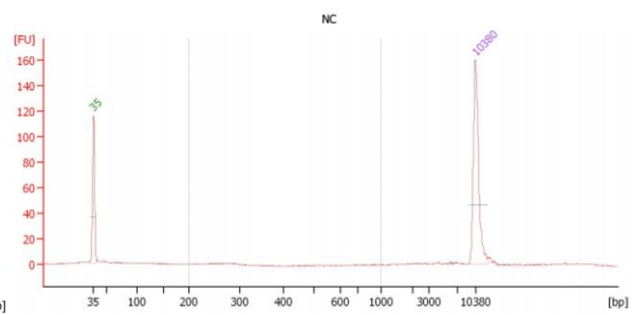


【扩增产物检测】

cDNA 扩增产物的产量与片段分布是判断实验是否成功的重要指标，推荐使用 Agilent 2100 Bioanalyzer 进行检测。取 1 μl 纯化后的 cDNA 扩增产物合理稀释后，使用 Agilent 2100 Bioanalyzer 和 High Sensitivity DNA Chip 进行检测，操作说明见 High Sensitivity DNA Chip 操作手册。一般情况下，根据使用的起始模板不同，成功的反应产出 2-50 ng 扩增产物，纯化成功的 cDNA 核酸的峰图分布于 600-10000 bp，主峰位于 2500 bp 左右，阴性对照应无产物出现。具体情况参照下图：



扩增成功 2100 示意图



阴性对照 2100 示意图

【产物保存】

纯化产物请保存于-20℃备用。

【建库方法】

推荐以下两种建库方法：

转座酶法建库（读长和数据量由用户根据实际需要自行确定）。

打断建库法（如需表达绝对定量，则建议采用打断建库法，数据分析方法则需与我公司技术支持取得联系）。

【问题解决方案】

| 问题 | 原因 | 措施 |
|-----------------|-----------------------|---|
| 无扩增产物 | 样本在收集过程中丢失 | 重新收集样本，确保操作准确。 |
| | 起始样本中含有逆转录酶抑制剂或 RNA 酶 | 建议实验前应使用清洁的 1× PBS 缓冲液对细胞进行清洗，确保样本中不含抑制剂或 RNA 酶 |
| | 酶失活 | 试剂盒除去 RNA 酶水外，所有的组份都应该在-20℃的条件下保存；试剂复融过程需在冰上进行，使用前分装，避免反复冻融 |
| 扩增产物含量低 | 起始样本中含有逆转录酶抑制剂或 RNA 酶 | 建议实验前应使用清洁的 1× PBS 缓冲液对细胞进行清洗，确保样本中不含抑制剂或 RNA 酶 |
| | RNA 降解 | 避免细胞或总 RNA 因储存或准备方法不当造成 RNA 的降解、影响扩增效率 |
| 阴性对照产生了与实验组相似产物 | 试剂被外源性核酸污染 | 避免试剂盒的组份与其他扩增产物或模板接触，并使用无核酸酶和无核酸污染的实验耗材进行逆转录与扩增，建议实验前应使用清洁的 1× PBS 缓冲液对细胞进行清洗，并确保实验环境中不含有外源 RNA、DNA 污染。 |
| | 操作台被外源性核酸污染 | 使用核酸去污剂彻底清理操作台 |
| | 阴性对照溶液被外源性核酸污染 | 使用新阴性对照 |

【注意事项】



1. 操作前必须仔细检查所有样品，应排除污染的样品；
2. 操作注意安全防护，穿戴防护衣物、一次性手套、口罩；所有直接接触过样本的物品应进行消毒后丢弃或再次使用，同时防止操作者脱落细胞的污染；
3. 使用前，试剂应混合均匀，尽量避免反复冻融；
4. 所使用的接触试剂的材料均要求干燥、洁净，以防止污染。操作过程中涉及的耗材如为一次性使用，则不得重复使用；
5. 实验人员必须进行专业培训，严格按照说明书操作；
6. 本试剂一次性使用，不同批号试剂禁止交叉使用，请勿使用过期试剂；
7. 样本应视为存在潜在的生物危害，实验结束后作为潜在传染源处理；
8. 操作应尽量迅速，减少准备过程中出现核酸污染或混入聚合酶抑制剂；
9. 避免样本因储存方法或准备方法不当造成的 RNA 降解；
10. 请严格按照试剂盒储存条件存放试剂盒各个组分，防止由于储存不当导致的试剂失效或其他不良结果；
11. 本试剂盒仅供科研使用，不用于临床诊断和其他用途；
12. 本试剂盒必须严格按照说明书进行操作，由于不按说明书操作引起的损失和伤害（相关法律特别要求的除外），本公司不承担由此引发的任何责任。

【基本信息】

生产企业：亿康基因科技有限公司

地址：上海：上海市徐汇区田林路 888 号科技绿洲一期 1 楼 102 室，200233

北京：北京市海淀区永丰产业基地永澄北路 2 号院 1 号楼绿海大厦 C 座 302 室，100094

江苏：江苏省泰州市药城大道一号 TQB 大楼 5 楼，225300

苏州：江苏省苏州市工业园区星湖街 218 号生物纳米园 B7 楼 201 室，215000

邮箱：technical@yikongenomics.com（技术支持）

info@yikongenomics.com（咨询）

order@yikongenomics.com（销售）

电话：+86-10-5091-7399（国际及中国港澳台），400-921-3918（中国大陆境内）

传真：+86-10-5091-7374

网址：www.yikongenomics.com

【版本号】180528.1

【识别码】PMC122

