

Single Cell Sequence Specific Amplification Kit

P621

Version 20.1



产品概述

Single Cell Sequence Specific Amplification Kit 是基于一步RT-PCR的扩增方法，用于实现单细胞或者微量总RNA中转录组的扩增，便于您揭开单个细胞之间不同基因的表达水平。本试剂盒实现了RNA提取纯化、逆转录和PCR反应在同一管内完成，不需要额外的操作，具有节约时间、减少实验误差、降低污染、提高灵敏度等优势。本试剂盒亦可适用于2 - 1,000个细胞的一步扩增，应用时需按照细胞数目减少一步扩增的循环数。

产品组分

组 分	P621-01(200 rxns)
2 × Reaction Mix ^a	500 μl
RT/Taq enzyme ^b	20 μl
Nuclease-free ddH ₂ O	2 × 1.25 ml

a. 包含dNTP Mix, Mg²⁺特异性增强因子。

b. 包含Hiscript II Reverse Transcriptase、RNase inhibitor、Champagne Taq DNA Polymerase。

保存条件

-30 ~ -15°C保存，≤0°C运输。

质量控制

所有组分经检测均无核酸外切酶，核酸内切酶，RNase残留。

功能测试：以单个小鼠杂交瘤细胞为模板，扩增Actb1基因，qPCR检测C_T值小于15。

注意事项

- RT/Taq enzyme 含有高浓度的甘油，使用前请短暂离心，收集到反应管底部，并用移液枪轻轻吸打，充分混匀后准确吸取。
- 反应液的配制请使用Nuclease-free的枪头、EP管等，尽量避免污染。

实验流程

1. Assay Pool的准备

将不同待测基因的扩增引物进行混合，制作成Assay Pool(各引物的终浓度为0.1 μM)。例如取20 μl Actb基因引物(上、下游10 μM浓度引物各10 μl)，加入980 μl Nuclease-free ddH₂O至终体积为1 ml(各引物的终浓度为0.1 μM)，最多可混合500对不同基因的扩增引物。

2. 在Nuclease-free离心管中配置如下反应体系

2 × Reaction Mix	2.5 μl
0.1 μM Assay Pool	0.5 μl
RT/Taq enzyme	0.1 μl
细胞样本*	0.5 - 1.0 μl
Nuclease-free ddH ₂ O	Up to 5.0 μl

*细胞可储存在PBS缓冲液中。

冰上放置待用，加入单细胞，盖紧管盖，立即置于-70°C冰箱2 min，3,000 rpm (1,000 × g) 离心2 min，立即放入PCR仪进行如下反应：

步骤	温度	时间	循环数
逆转录	50°C	60 min	1
预变性	95°C	3 min	1
变性	95°C	15 sec	20*
退火、延伸	60°C	15 min	
Hold	4°C		

*建议循环数随起始细胞数量作相应调整：1个细胞20循环，10个细胞17循环，100个细胞14个循环，1,000个细胞11个循环。

反应结束后，每管加入20 µl Nuclease-free ddH₂O (1:5 稀释)，涡旋混匀，3,000 rpm (1,000 × g) 离心2 min，立即进行后续qPCR反应或-20°C保存。适用的qPCR仪系统包括Fluidigm BioMark高通量qPCR系统，及各种96-well或384-well qPCR系统。

3. qPCR反应体系 (以ABI StepOne plus为测试机型)

配制如下反应mix：

Ace qPCR SYBR Green Master Mix	10.0 µl
Primer 1 (10 µM)	0.5 µl
Primer 2 (10 µM)	0.5 µl
ROX Reference Dye1	0.4 µl
模板DNA*	1.0 µl
Nuclease-free ddH ₂ O	7.6 µl

*模板DNA需要做进一步稀释 (稀释10倍)，减少移液误差。

3,000 rpm (1,000 × g) 离心2 min，立即置于qPCR仪进行如下反应：

Stage 1	预变性	Reps: 1	95°C	5 min
Stage 2	循环反应	Reps: 40	95°C	10 sec
			60°C	30 sec
Stage 3	溶解曲线	Reps: 1	95°C	15 sec
			60°C	60 sec
			95°C	15 sec

*所有商标均属于各自商标所有者的财产。某些商标并未在全部行政区注册。