Single Cell Sequence Specific Amplification Kit

P621-01

Version 5.1

Vazyme

Vazyme biotech co., ltd.

产品简介

Single Cell Squence 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2-1000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。

产品组成

组　分	P621-01（200 rxn）
2 × Reaction Mix [a]	500 μl
RT/Taq enzyme [b]	20 μl
Nuclease free水	1.25 ml × 2

a. 包含dNTP Mix, Mg^{2+}特异性增强因子。

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

储存条件

- 20 °C保存。

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Ct值小于15。

应用实例

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10 μl Actb和10 μl Gapdh基因引物（10 μM，不同上、下游引物)，加入980 μl Nuclease free水至终体积为1 ml (确保各引物的终浓度为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RT–PreAmp Master Mix

2 × Reaction Mix	2.5 μl
0.1 μM Assay Pool	0.5 μl
RT/Taq enzyme	0.1 μl
Nuclease free水	1.9 μl
总计	5.0 μl

冰上放置待用，加入单细胞，盖紧管盖，立即置于- 80°C冰箱2 min，3000 rpm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 s	20
退火、延伸	60 °C	15 min	
Hold	4 °C		

反应结束后，每管加入20 μl Nuclease free水（1:5 稀释)，涡旋混匀，3000 rpm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 μl
Primer 1 (10 μM)	0.5 μl
Primer 2 (10 μM)	0.5 μl
ROX Reference Dye1	0.4 μl
模板 DNA[a]	1 μl
Nuclease free水	7.6 μl

a. 模板DNA需要做进一步稀释（稀释10倍），减少移液误差。

3000 rpm离心2 min，立即置于qPCR仪进行如下反应：

Stage1 预变性	Reps：1	95 °C	5 min
Stage2 循环反应	Reps：40	95 °C	10 sec
		60 °C	30 sec
Stage3 溶解曲线	Reps：40	95 °C	15 sec
		60 °C	60 sec
		95 °C	15 sec

注意事项

1. 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。
2. 反应液的配制请使用Nuclease free的枪头、EP管等，尽量避免污染。