

单细胞 PCR 扩增试剂盒

Cat: DTT05

1. 产品简介

本产品可以以单细胞或者微量总 RNA 为模板，在同一管内实现 RNA 提取、逆转录步骤，不需要额外的操作，具有节约时间、降低污染、提高灵敏度等优势。另本试剂盒亦可适用于 1,000 个细胞以下的 PCR 扩增（细胞应在 PBS 中洗涤，因为培养基会影响合成 cDNA 的效率）。

2. 产品组分

试剂名称	96 rxns	储存条件
dNTP Mix	192μl	-20°C
Cell Lysis Buffer	96μl	-20°C
RT Primer	38.4μl	-20°C
DTT	96μl	-20°C
RNase Inhibitor	38.4μl	-20°C
Reverse Transcriptase	38.4μl	-20°C
2 × PCR Mix	4ml	-20°C
PCR Primer Mix	480μl	-20°C
RNase- Free water	2ml	-20°C
TS-Primer	96μl	-80°C
5 × RT Buffer	384μl	-80°C

3. 自备材料

- 1) 单细胞样本或微量细胞及微量 RNA;
- 2) 振荡器、瞬时离心机，PCR 仪等。

4. 试验步骤

4.1 RT-A

- 1 将 dNTP Mix、RT Primer 以及 Cell Lysis Buffer 从-20°C 冰箱中取出，在冰上进行融化，待完全融化后

涡旋混匀，瞬时离心。

按照下表配制 RT-A 反应液

序号	组分	μl/Rxn
1	Cell ^a	1-6.6μl
2	RNA	10pg-10ng 带 polyA 的总 RNA
3	dNTP Mix	2μl
4	Cell Lysis Buffer ^b	1μl
5	RT Primer	0.4μl
6	RNase- Free water	补至 10μl

注：a：如果是流式或者其他方式分选的单细胞不需要 PBS 处理，通过稀释或者培养获得细胞需通过 PBS 清洗重选后使用，培养基会影响 cDNA 的合成。

b:模板为 RNA 时不添加此试剂。

轻轻涡旋混匀，瞬时离心。72℃反应 3min，结束后立即放于冰上不少于 3min，进行后续反应。

4.2 RT-B

将 RT-B 试剂从-20℃冰箱中取出（其中 TS-Primer、Reverse Transcriptase（轻弹混匀，勿涡旋））。瞬时离心，按照下表配制 cDNA 第一链合成反应体系：

序号	组分名称	体积（μl）
1	DTT	1
2	RNase Inhibitor	0.4
3	TS-Primer	1
4	5 × RT Buffer	4
5	Reverse Transcriptase	0.4
6	RNase- Free water	3.2
7	RT-A 产物	10.0

注：1、TS Primer、Reverse Transcriptase 轻弹混匀，瞬时离心，勿涡旋；

2、5 × RT Buffer、TS-Primer 于-80℃保存，如多次使用请分装，尽量避免反复冻融。

轻轻涡旋混匀，瞬时离心后置于冰上。待 PCR 仪温度升至 42℃，放入 PCR 板，程序如下所示：

序号	温度（℃）	时间
1	42℃	90 min
2	70 °C	15 min
3	4 °C	Hold

反应结束后可将产物置于冰上或于 4℃短期保存，以进行后续扩增，

注：此步骤建议不暂停。

4.3 cDNA 全长扩增

将 PCR 试剂从各冰箱中取出，冰上融化，待完全融化后，涡旋混匀，瞬时离心后按照下表配制 PCR

反应体系（所有步骤均在冰上操作）。

序号	组分名称	体积 (μl)
1	2 × PCR Mix	25.0
2	PCR Primer Mix	5.0
3	RT-B 产物	20.0
	总体积	50.0

将上表混合液轻轻涡旋混匀，瞬时离心。在 PCR 仪上反应，具体反应程序如下：

序号	程序	温度 (°C)	时间	循环数
1	预变性	98	1min	1
2	变性	98	10s	22
3	退火	62	15s	
4	延伸	72	3min	
5	延伸	72	5min	1
6	保存	4	hold	1

待反应结束后，瞬时离心，然后将 PCR 产物放置于冰上备用或于-20℃保存。

5. 注意事项

- 1) PCR 操作均在冰上进行；
- 2) 所有 PCR 试剂及耗材需无酶无菌；

感谢您选择德泰生物，我们竭诚为您服务！

For Research Use Only!