

产品概述

AcuGenix™ First-Strand cDNA Synthesis Kit (for Single-Cell 3' RNA-Seq)采用经基因工程改造的逆转录酶, 可通过 Oligo(dT)引物与 mRNA 的 poly(A)尾结合启动逆转录, 并沿 mRNA 模板合成第一链 cDNA。当逆转录延伸至 mRNA 的 5' 端时, 该酶的末端转移酶活性会在新合成 cDNA 的 3' 端添加 3 个胞嘧啶 (C), 形成 poly(C)尾; 该非模板依赖加尾产物可作为预先加入的模板转换寡核苷酸 (Template Switching Oligo, TSO) 的锚定位点-TSO 的 3' 端带有 3 个鸟嘌呤 (G), 可与 poly(C)尾互补配对实现退火结合。随后逆转录酶发生模板转换, 以 TSO 为模板继续延伸直至其末端, 最终获得两端均带有已知固定序列的全长单链 cDNA。后续可通过 cDNA 扩增、酶切片段化等流程构建测序文库。

与野生型 M-MLV 逆转录酶相比, 本试剂盒所用酶的热稳定性、逆转录效率均显著提升, 且对高浓度二硫苏糖醇 (DTT) 具有良好耐受性。本产品适用于哺乳动物细胞或无细胞壁真核细胞的单细胞高通量全长 cDNA 合成, 可兼容 10 pg~1 μg 含 poly(A) 尾的总 RNA。

试剂组成

组分名称	BR3N801-01 (8 T)	BR3N801-02 (20 T)	BR3N801-07 (100 T)
4×RT Buffer	151 μL	376 μL	0.94 mL×2
Reverse Transcriptase	36 μL	90 μL	450 μL

保存条件

-20±5℃存储。

注意事项

1. 本产品不含 RNA 酶抑制剂, 请自备。
2. 文库构建所需要的其他试剂需自备或另外购买。
3. 请使用无 RNase 污染的耗材, 并定期清洁实验区域, 避免 RNase 污染。
4. 使用前请充分混匀所有组分, 避免反复冻融。
5. 本产品仅作科研用途。

使用方法

方法 1: 高通量单细胞实验

需根据不同单细胞仪器的操作要求调整方案, 以下以 10× Genomics 单细胞平台为例:

1. 反应体系配制

- 1.1 反应混合液配制: 提前解冻 4×逆转录缓冲液、模板转换寡核苷酸 (TSO, 用户自备)、还原剂 B (用户自备) 及 RNase 抑制剂 (40 U/μL, 用户自备)。颠倒混匀后瞬时离心, 置于冰上备用。

表 1 反应液体系

名称	体积 (μL)
4×RT Buffer	18.8
Template Switch Oligo	3.1
Reducing Agent B	2
RNase Inhibitor (40 U/μL)	1.6
Reverse Transcriptase	4.5

Total	30
-------	----

1.2 在低吸附离心管中按表 1 依次加入各组分, 用移液器轻轻吹打混匀, 瞬时离心后将反应管置于冰上, 用于后续实验。

1.3 后续操作请参照对应仪器的官方手册执行。

方法 2: 单细胞或常规批量 mRNA 的 cDNA 合成:

请按以下步骤操作:

1. RNA 预变性

1.1 将 Oligo(dT)₁₈ (20~50 uM, 自备) 于室温或冰面上解冻, 颠倒或用手指轻弹混匀后瞬时离心, 置于冰上备用。按照表 2 配制反应液。

表 2 RNA 预变性反应体系

名称	体积 (μL)
Oligo(dT) ₁₈ (20~50uM) (自备)	1
已裂解的 cell or RNA	10
Total	11

1.2 用移液器轻轻吹打混匀, 瞬时离心将管壁反应液离心至管底, 在 PCR 仪上进行如下反应: (热盖 80°C) 70°C, 5 min; 立即置于冰上 3 min。

2. 第一链 cDNA 合成

2.1 从-20°C取出第一链合成所需试剂, 于室温或冰上解冻, 颠倒混匀后瞬时离心, 将管壁液体收集至管底, 置于冰上备用。

按表 3 配制第一链 cDNA 合成反应体系:

表 3 第一链 cDNA 合成反应体系

名称	体积 (μL)
上一步	11
4×RT Buffer	5
TSO Primer (自备, 浓度需自行摸索)	1
RNase Inhibitor (40 U/μL)	0.5
Reverse Transcriptase	1
ddH ₂ O	1.5
Total	20

2.2 用移液器轻轻吹打混匀, 并瞬时离心将反应液收集至管底。立即放入 PCR 仪中进行如下反应 (热盖 105°C): 42°C 孵育 60 min; 75°C 孵育 15 min; 4°C 暂存。

2.3 产物可直接用于二链 cDNA 合成或者-20°C 暂存, 长期保存请置于-80°C。