

GenNext[®] RamDA-seq[™] Single Cell Kit

(Code No. RMD-101, RMD-101T)

NSR Primer Set for human
(Code No. NSR-101)

NSR Primer Set for mouse
(Code No. NSR-102)

使用说明书

TOYOBO CO., LTD. Biotech support Department
OSAKA JAPAN

- 目录 -

[1] 前言	- 1 -
[2] 产品组成	- 2 -
[3] 其他必需品	- 2 -
[4] 使用方法	- 3 -
1. 细胞裂解或 RNA 稀释 (Cell lysis or RNA dilution)	- 3 -
2. 热变性反应 (Denature)	- 4 -
3. 基因组去除反应 (Digestion of genomic DNA)	- 5 -
4. cDNA 合成及扩增反应 (RT-RamDA™ 反应)	- 5 -
5. 第二链合成反应 (2nd strand synthesis)	- 6 -
6. 文库制备	- 6 -
7. 文库的验证	- 8 -
8. 测序数据的确认	- 9 -
[5] 实验例	- 10 -
1. 检测到的转录产物数量及各区域 alignment 比例的比较	- 10 -
2. 长链 RNA 全长性的比较	- 10 -
[6] 常见问题	- 11 -
[7] 相关产品	- 11 -
[8] 参考文献	- 11 -

- 注意事项 -

本产品为科研用试剂。请勿作为诊断、临床试剂使用。在使用时，请严格遵守实验室的一般注意事项，安全操作。

※illumina®、Nextera™ 是 illumina Inc. 的注册商标或商标。

※MultiNA® 是株式会社岛津制作所的注册商标。

※RamDA-seq™ 是国立研究开发法人理化研究所的商标。

[1] 前言

RamDA-seq™ Single Cell Kit 是从单细胞或微量 RNA 开始制备 NGS 分析用 cDNA 的试剂盒。使用本产品可制备 Full-length total RNA-seq 用 cDNA。

本试剂盒在 Reverse Transcription with Random Displacement Amplification (RT-RamDA™)法^{参考文献(1)}的基础上开发。该方法是利用逆转录酶的链转换活性实现 cDNA 扩增的新技术，除了常规 poly(A) RNA，也可以高灵敏度地逆转录出 non-poly(A)来源的 cDNA。因此，RT-RamDA™ 技术相比原来的 cDNA 合成方法能检测到更多基因。

注：本试剂盒不含文库制备试剂和磁珠。

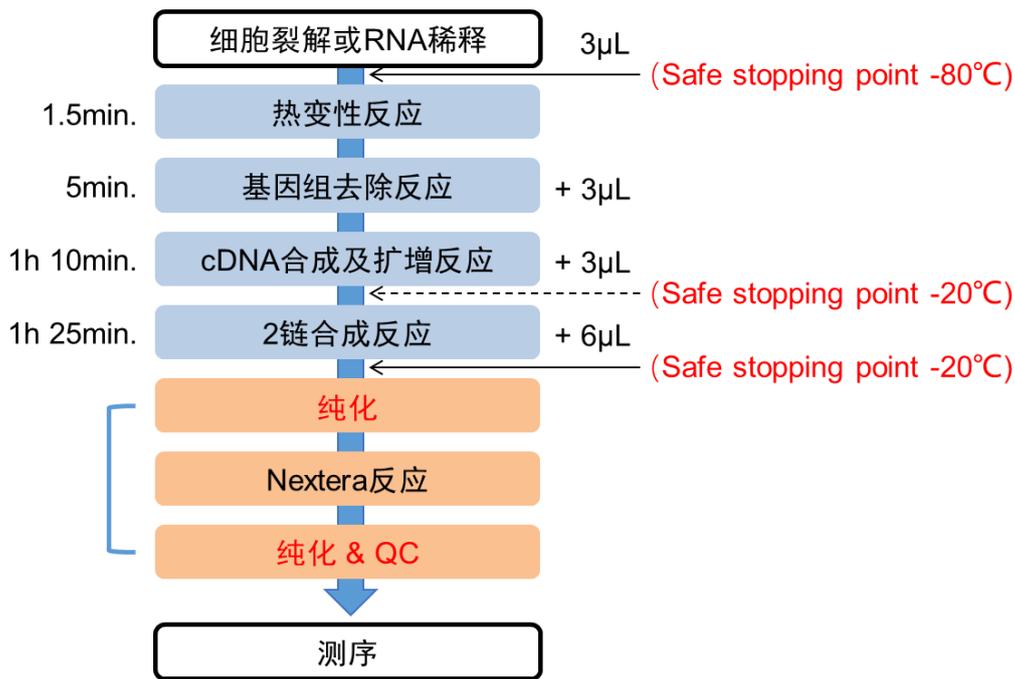


图 1. 本试剂盒的工作流程

◆本试剂盒的特征◆

1. 可从单细胞或微量 RNA 制备 cDNA
可以使用 1~100 个细胞或者 10pg~1ng total RNA 作为起始模板。
2. 可分析全长 cDNA
使用本产品可以制备出测序 reads 覆盖全长 RNA（10kb 以上）的 cDNA。
3. 可检测各种 RNA，且能检测到的基因数相比原来技术大大提高
 - ◆ 可进行转录本 isoform 或可变剪切的鉴定
 - ◆ poly(A) RNA 或 non-poly(A) RNA (组蛋白 RNA 或 lncRNA)的检测
 - ◆ 核内 RNA(pre-mRNA 或 lncRNA)的检测

[2] 产品组成

本试剂盒中含有以下试剂。试剂请放-20℃保存。

RamDA-seq™ Single Cell Kit (Code: RMD-101, RMD-101T)

试剂名称	保存	(RMD-101)	(RMD-101T)
①Lysis Buffer	-20℃	480μL	120μL
②Lysis Enhancer	-20℃	108μL	27μL
③RNase Inhibitor	-20℃	22μL	6μL
④Nuclease free water	-20℃	960μL	240μL
⑤RT-RamDA™ Buffer	-20℃	240μL	60μL
⑥RT-RamDA™ Enzyme Mix	-20℃	54μL	14μL
⑦RT-RamDA™ Primer Mix	-20℃	54μL	14μL
⑧gDNA Remover	-20℃	54μL	14μL
⑨2nd strand synthesis Buffer	-20℃	330μL	83μL
⑩2nd strand synthesis Enzyme	-20℃	55μL	145μL
⑪2nd strand synthesis Primer Mix	-20℃	275μL	69μL

NSR Primer Set for human (Code: NSR-101)

1st NSR Primer Mix for human	-20℃	54μL
2nd NSR Primer Mix for human	-20℃	275μL

NSR Primer Set for mouse (Code: NSR-102)

1st NSR Primer Mix for mouse	-20℃	54μL
2nd NSR Primer Mix for mouse	-20℃	275μL

[3] 其他必需品

除本产品外，请准备以下仪器·试剂。

- PCR 仪或恒温仪。使用时，请根据各仪器说明书进行操作。
- 磁珠。推荐 Agencourt AMPure XP 试剂（Beckman Coulter、目录编号：A63880、A63881 等）。使用时，请根据试剂说明书进行操作。
- 磁力架。使用磁珠进行纯化时使用。
- 80%的乙醇。作为使用磁珠纯化时的洗涤液使用。
- 文库制备试剂。请使用 illumina 公司的 Nextera™ XT DNA Sample Kit。

产品名	目录编号
Nextera™ XT DNA Sample Kit (24 Samples)	FC-131-1024
Nextera™ XT DNA Sample Kit (96 Samples)	FC-131-1096

- TE Buffer (10mM Tris 1mM EDTA) pH8.0。文库制备时用于溶解 DNA。不能用水代替。

[4] 使用方法

本试剂盒可使用细胞或提纯的 total RNA。使用 FACS 获得细胞时请从 [section 1. A](#) 开始；使用 FACS 以外的方法得到细胞时请从 [section 1. B](#) 开始；使用提纯的 total RNA 时请从 [section 1. C](#) 开始。然后进入 [section 2. 热变性反应步骤](#)。

样品		细胞裂解 / RNA 稀释	热变性反应
细胞	FACS	section 1. A	section 2.
	FACS 以外	section 1. B	
Total RNA		section 1. C	

1. 细胞裂解或 RNA 稀释 (Cell lysis or RNA dilution)

A. 使用 FACS 获得细胞时：

(1) 将细胞裂解需要的试剂制备于离心管中。请参考下表，制备比必需量稍有余量的裂解液。

细胞裂解液的制备

	1 个反应(μL)	20 个反应(μL)*	100 个反应(μL)*
①Lysis Buffer	2	44	220
②Lysis Enhancer	0.45	9.9	49.5
③RNase Inhibitor	0.05	1.1	5.5
④Nuclease free water	0.5	11	55
Total	3	66	330

※余量为 10%时

(2) 向 96 孔板或 8 连管中每孔分装 3μL 细胞裂解液。注意冰上操作，分装后请立刻封膜或盖上管盖。

(3) 细胞分选前，请将离心管一直置于冰上或 4℃保存，请根据所用 FACS 的操作说明书或厂家推荐的参数进行细胞分选。

(4) 细胞分选后，请进行密封，离心。

(5) 随后，迅速进行下一步或将样品置于-80℃保存。

B. FACS 以外的方法获取细胞时：

使用人工拣选等细胞获取方法时，为了保证充分裂解，请控制细胞样品的液量小于 0.5μL。

(1) 将细胞裂解需要的试剂预混在离心管中。请参考下表，提前制备如下试剂，等待添加细胞样品。细胞样品的液量不足 0.5μL 时，请根据情况调整水的添加量。

例) 细胞样品液量 0.5μL 时，细胞裂解液的制备

	1 个反应(μL)	20 个反应(μL) *	100 个反应(μL) *
①Lysis Buffer	2	44	220
②Lysis Enhancer	0.45	9.9	49.5
③RNase Inhibitor	0.05	1.1	5.5
细胞样品 (不足 0.5μL)	x		
④Nuclease free water	0.5-x	(0.5-x) × 22	(0.5-x) × 110
Total	3	60	300

※余量为 10%时

- (2) 向 96 孔板或 8 连管中每孔分装细胞裂解液 2.5 μ L (或(3-x) μ L)。分装在冰上进行, 分装后请立刻密封、离心。
- (3) 添加细胞样品前, 请将离心管一直置于冰上或 4 $^{\circ}$ C 保存, 请根据所用细胞获取仪器的操作说明书, 添加细胞样品。
- (4) 添加细胞样品后, 请进行密封, 离心。
- (5) 随后, 迅速进行下一步或将样品置于-80 $^{\circ}$ C 保存。

C. 使用提纯后的 total RNA 时:

- (1) 请将 RNA 溶液的 90% 稀释为 RNA 稀释液。请参考下表, 在必要量的离心管中制备 RNA 稀释液。

RNA 稀释液的制备

	100 个反应(μ L)
①Lysis Buffer	220
②Lysis Enhancer	49.5
③RNase Inhibitor	5.5
④Nuclease free water	55
Total	330

RNA 稀释例)

输入量为 1ng 时 (333pg/ μ L total RNA 溶液)

	(μ L)
10ng/ μ L total RNA	1
RNA 稀释液	29
Total	30

输入量为 10pg 时 (3.3pg/ μ L total RNA 溶液)

	(μ L)
333pg/ μ L total RNA	1
RNA 稀释液	99
Total	100

- (2) 向 96 孔板或 8 连管中每孔分装稀释后的 RNA 溶液 3 μ L。
- (3) 分装后, 请进行密封, 离心。
- (4) 随后, 迅速进行下一步或将样品置于-80 $^{\circ}$ C 保存。

2. 热变性反应 (Denature)

- (1) 请将样品板或离心管置于 4 $^{\circ}$ C 离心、在以下温度进行温育。
使用冻结样品时, 热变性反应前, 请置于 4 $^{\circ}$ C 融解、离心后再进行热变性反应。

热变性反应

步骤	温度	时间
Denature	70 $^{\circ}$ C	1.5min.
	4 $^{\circ}$ C	hold

3. 基因组去除反应 (Digestion of genomic DNA)

(1) 将基因组去除反应必需的试剂预混于离心管中。请参考以下体系进行制备。

* 使用 ERCC RNA 等对照 RNA 时请调整④Nuclease free water 的添加量。

基因组去除反应液的制备

	1 个反应(μL)	20 个反应(μL)*	100 个反应(μL)*
⑤RT-RamDA™ Buffer	0.3	6.6	33
⑧gDNA Remover	0.45	9.9	49.5
④Nuclease free water*	2.25	49.5	247.5
Total	3	66	330

※余量为 10%时

(2) 向进行热变性反应之后的 96 孔板或 8 连管中每孔分装 3μL 基因组反应液，离心后，请在以下温度条件下进行温育。

基因组去除反应

步骤	温度	时间
Genomic DNA digestion	30°C	5min.
	4°C	hold

(3) 基因组反应后，迅速进行下一步反应。

4. cDNA 合成及扩增反应 (RT-RamDA™ 反应)

(1) 在离心管中配制 RT-RamDA™ 反应必需的试剂。请参考下表进行配制。

* 使用 NSR Primer 时，请使用 1st NSR Primer Mix for human 或 1st NSR Primer Mix for mouse 代替⑦RT-RamDA™ Primer Mix 进行反应。

RT-RamDA™ 反应液

	1 个反应(μL)	20 个反应(μL)*	100 个反应(μL)*
⑤RT-RamDA™ Buffer	1.5	33	165
⑥RT-RamDA™ Enzyme Mix	0.45	9.9	49.5
⑦RT-RamDA™ Primer Mix*	0.45	9.9	49.5
④Nuclease free water	0.6	13.2	66
Total	3	66	330

※余量为 10%时

(2) 向进行过基因组去除反应的 96 孔板或 8 连管中每管添加 RT-RamDA™ 反应液 3μL，离心后，请在以下温度条件下进行温育。

RT-RamDA™ 反应

步骤	温度	时间
Priming 1	25°C	10min.
Priming 2	30°C	10min.
Reverse transcription and amplification	37°C	30min.
Reverse transcription 2	50°C	5min.
Inactivation	98°C	5min.
	4°C	hold

(3) RT-RamDA™ 反应后，迅速进行下一步反应或将样品置于-20°C~-30°C保存。

5. 第二链合成反应 (2nd strand synthesis)

(1) 在离心管里配制第二链合成反应必需的试剂。请参考下表进行配制。

* 使用 NSR Primer 时, 请使用 2nd NSR Primer Mix for human 或 2nd NSR Primer Mix for mouse 代替 2nd strand synthesis Primer Mix 进行反应。

第二链合成反应液

	1 个反应(μ L)	20 个反应(μ L)*	100 个反应(μ L)*
⑨2nd strand synthesis Buffer	3	63	315
⑩2nd strand synthesis Enzyme	0.5	10.5	52.5
⑪2nd strand synthesis Primer Mix*	2.5	52.5	262.5
Total	6	126	630

※余量为 5%时

(2) 向进行了 RT-RamDA™ 反应的 96 孔板或 8 连管中每管分装第二链合成反应液 6 μ L, 离心后, 在以下温度条件下进行温育。

第二链合成反应

步骤	温度	时间
Second-strand synthesis	16°C	60min.
Inactivation	70°C	10min.
	4°C	hold

(3) 第二链合成反应后, 迅速进行下一步反应或将样品置于-20°C~-30°C保存。

6. 文库制备

本试剂盒的文库制备步骤, 是按 illumina 公司 Nextera™ XT DNA 文库制备试剂盒推荐体系的四分之一进行操作的步骤。请注意: 以下有所变更的步骤, 仅适用于本试剂盒。

另外, 关于文库制备的详细操作步骤, 请参考 illumina Nextera™ XT DNA 文库制备指导进行确认。

A. 双链 cDNA 的纯化

(1) 请制备用于纯化步骤的 1/4 稀释过的 AMPure XP beads。

稀释时, 请先将 AMPure XP beads 进行离心, 上清液作为稀释液使用。

例) 8 个样品份的 1/4 稀释的 AMPure XP beads 的配制方法:

- 将 1 \times AMPure XP beads 220 μ L 静止于磁力架上, 待磁珠完全吸附后, 取出上清作为稀释液使用。
- 请将 a 步制备的上清 180 μ L 与 1 \times AMPure XP beads 60 μ L 充分混合, 作为 1/4 稀释的 AMPure XP beads 进行使用。

(2) 请向 15 μ L 双链 cDNA 溶液中添加 1/4 稀释的 AMPure XP beads 27 μ L。然后进行离心、25°C、2,000rpm 离心后, 请搅拌 2 分钟, 静置 5 分钟。

(3) 将离心管或板置于磁力架上, 直至溶液澄清。随后移除上清。

(4) 将离心管或板置于磁力架上, 添加 80%乙醇 150 μ L、室温温育 30 秒。

(5) 去除乙醇。

- (6) 继续将离心管或板置于磁力架上，添加 80%乙醇 150 μ L、室温温育 30 秒。
- (7) 使用移液器，将乙醇完全去除。有乙醇残留时，请更换枪头，彻底吸净乙醇。
- (8) 继续将离心管或板置于磁力架上，25 $^{\circ}$ C 放置 5 分钟，进行干燥*。
- * 如果乙醇有残留，可能会导致实验失败。请在磁珠开始龟裂之前进行干燥。请根据室温及湿度，调整干燥时间。
- (9) 干燥的同时，用离心管配制溶解用试剂。请参考下表进行制备。

溶出用溶液

	1 个反应(μ L)	100 个反应(μ L) *
Tagment DNA Buffer (Nextera™ XT DNA Sample prep kit)	2.5	270
④Nuclease free water	1.25	135
Total	3.75	405

※余量为 8%时

- (10) 向 96 孔板或 8 连管中每管添加 3.75 μ L 溶解用试剂，离心。
- (11) 在磁珠完全分散之前进行 Vortex 振荡，然后 25 $^{\circ}$ C 温育 5 分钟、离心。
- (12) 将离心管或板置于磁力架上，静置 5 分钟直至溶液澄清。
- (13) 请将 3.75 μ L 澄清的上清转移到离心管或板中，再进行下面的步骤。

B. Tagmentation (Nextera™ XT DNA 文库制备)

- (1) 向提纯的双链 cDNA 中每管添加 1.25 μ L Amplicon Tagment Buffer，离心后，请在以下温度条件下进行温育。

Tagmentation 反应

步骤	温度	时间
Tagmentation	55 $^{\circ}$ C	5min.
	10 $^{\circ}$ C	hold

C. 中和反应 (Nextera™ XT DNA 文库制备)

- (1) 向 tagmentation 之后的双链 cDNA 中每管添加 1.25 μ L Neutralization Buffer。随后进行离心，在 25 $^{\circ}$ C 条件下，2000rpm 混匀 1 分钟，随后静置 5 分钟。

D. library enrichment (Nextera™ XT DNA 文库制备)

- (1) 向中和的双链 cDNA 中每管添加 3.75 μ L NPM PCR Master Mix，进行离心。之后，向各管中分别添加 Index primer(S5XX)和 Index primer(S7XX)各 1.25 μ L、离心。

(2) 离心后，请按以下循环条件进行 PCR。

步骤	温度	时间	
	72°C	3min.	
Denature	95°C	30sec.	
PCR	95°C	10sec.	14 cycles*
	55°C	30sec.	
	72°C	30sec.	
	72°C	5min.	
	4°C	hold	

* 请参考下表内容调整 PCR 循环条件。

Estimated amount of total RNA per cell / total RNA amount	Typical Number of PCR Cycles
>10pg	14
5-10pg	14-15

* RNA 量低于 5pg 时，可增加 PCR 循环数。

* 得到的文库量较多时，可减少 PCR 循环数。

E. 文库的纯化

- (1) 每 12.5μL PCR 溶液中请添加 15μL 1×AMPure XP beads。随后离心，25°C、2,000rpm 混匀 2 分钟，然后静置 5 分钟。
- (2) 将离心管或板置于磁力架上，直至溶液澄清。之后，去除上清。
- (3) 将离心管或板置于磁力架上，然后添加 80%乙醇 150μL、室温温育 30 秒。
- (4) 去除乙醇。
- (5) 继续将离心管或板置于磁力架上，添加 80%乙醇 150μL、室温温育 30 秒。
- (6) 使用移液器，将乙醇完全去除。
- (7) 继续将离心管或板置于磁力架上，25°C放置 5 分钟，进行干燥*。
* 如果乙醇有残留，则可能会导致实验失败。请在磁珠开始龟裂之前进行干燥。请根据室温及湿度，调整干燥时间。
- (8) 向 96 孔板或 8 连管中每管添加 24μL TE Buffer、离心。
- (9) 在磁珠完全分散之前进行 Vortex 振荡，然后 25°C温育 5 分钟、离心。
- (10) 将离心管或板置于磁力架上，静置 5 分钟直至溶液澄清。
- (11) 将 24μL 澄清的上清液转移到离心管或板中，请进行 QC 操作或放于 -20°C保存。

7. 文库的验证

A. 文库的定量

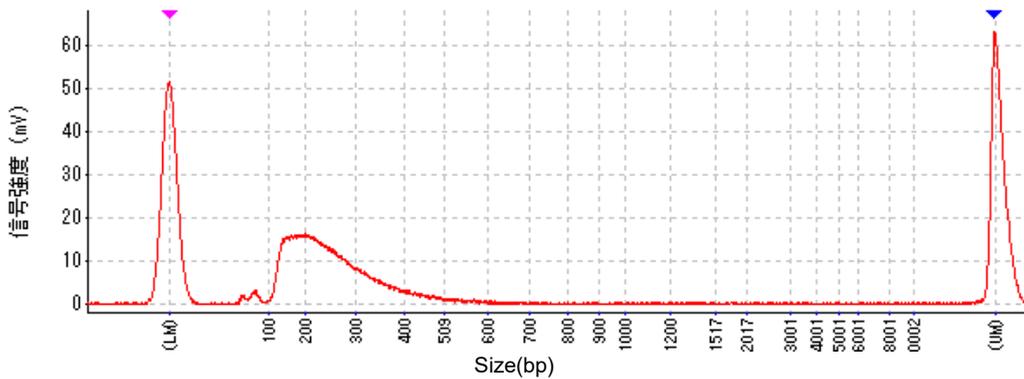
推荐使用 GenNext® NGS Library Quantification Kit(Code: NLQ-101)或同类市售商品进行 qPCR 定量。GenNext® NGS Library Quantification Kit 是 illumina NGS 测序仪用的文库定量试剂盒、适用于 illumina 采用的 P5、P7 adaptor 序列，可特异且正确地定量只与 Flow cell 结合的文库。

B. 文库 size 分布的确认

确认文库分布时，推荐使用 Bioanalyzer (Agilent · technology 株式会社)、MultiNA® (株式会社岛津制作所) 等平台进行电泳确认。

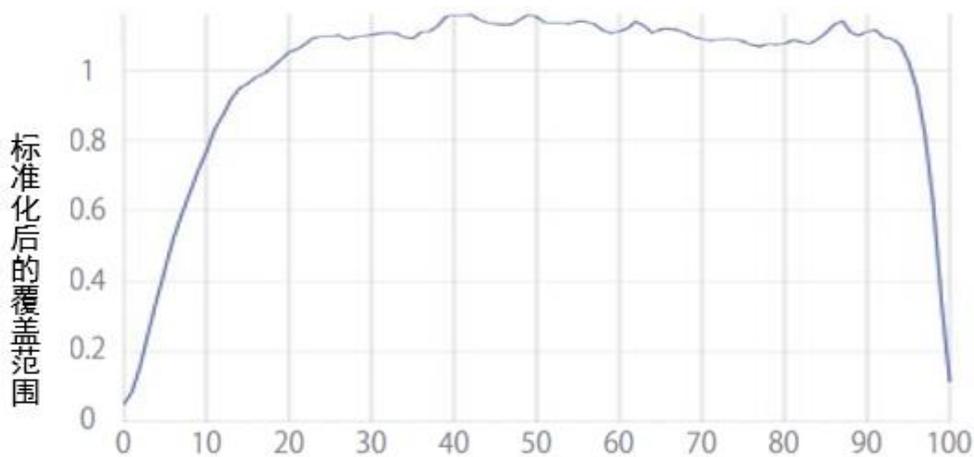
文库分布例

使用本试剂盒与 Nextera™ XT DNA 文库制备试剂盒(14cycle)，进行小鼠 ES 细胞的单细胞 NGS 文库制备时，如下图所示，已确认最终文库大约分布在 100bp~600bp 之内，得率大约为 10~20nM(溶于 24μL TE buffer)。



8. 测序数据的确认

推荐在分析测序数据之前先确认覆盖范围的均一性。本试剂盒可得到均一的覆盖范围，如下图所示。



根据逆转录产物长度进行标准化的碱基位置5'-3' (%)

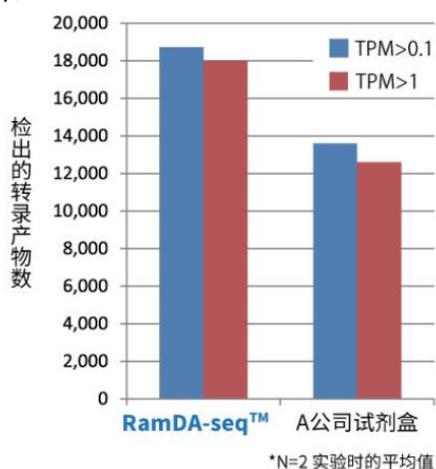
[5] 实验例

1. 检测到的转录产物数量及各区域 alignment 比例的比较

<方法>

使用从 Mouse ES 细胞提取的 Total RNA 10pg, 分别用 GenNext® RamDA-seq™ Single Cell Kit (Code: RMD-101)和 A 公司的试剂盒, 同时制备 cDNA、双链 DNA 并进行 NGS 分析。使用 GenNext® RamDA-seq™ Single Cell Kit 时使用了 NSR Primer Set for mouse(NSR-102)引物。GenNext® RamDA-seq™ Single Cell Kit 因为无需扩增 cDNA, 而 A 公司的试剂盒, 则进行了 18 个循环的扩增。之后, 使用 Nextera XT DNA Library Preparation Kit 进行文库的制备、使用 illumina Miseq 进行测序。

<结果>



Percentage of reads(%)	RamDA-seq™		A公司试剂盒	
	90.9	86.1	89.5	90.7
Mapped reads	90.9	86.1	89.5	90.7
rRNA+mitochondria	24.0	23.0	9.0	9.9
CDS	27.8	26.3	41.9	41.5
UTR	16.5	15.8	21.9	22.3
Introns	16.2	14.8	9.1	9.0
Intergenic regions	6.4	6.2	7.6	8.0
Number of transcripts TPM* > 0.1	18,984	18,465	13,500	13,721
Number of transcripts TPM* > 1	18,338	17,629	12,575	12,616

· 各试剂中, N=2进行实验
· 将read数标准化并进行分析
· 黄色格子中的数值不是%而是个数

*TPM(Transcripts Per Million): 针对各逆转转录产物的read计数, 对基因长度进行校正为1,000bp后, 将各样品的总read数全部校准为100万时的数值。

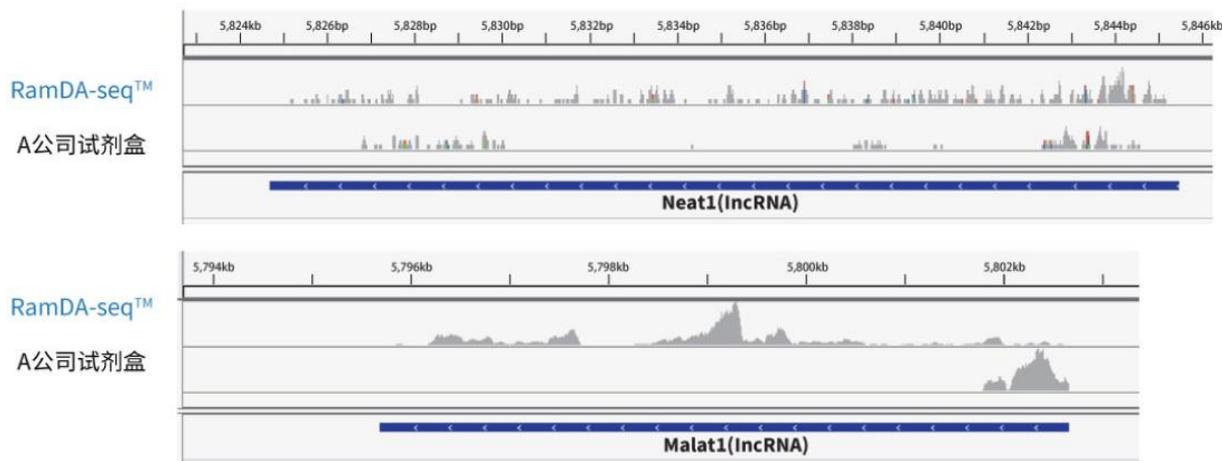
与 A 公司的试剂盒相比, GenNext® RamDA-seq™ Single Cell Kit 的检测量更多, 可以检测到大约 5,000 个转录产物。

2. 长链 RNA 全长性的比较

<方法>

对实验例 1 得到的测序数据进行分析。

<结果>



GenNext® RamDA-seq™ Single Cell Kit 可以在全长范围内检测到用 A 公司的试剂盒难以检测的 Neat1 及 Malat1 这样的 lncRNA。

[6] 常见问题

现象	原因	对策
得到的 cDNA 比较少	RNA 降解了	<ul style="list-style-type: none"> · 请确认 RNA 没有降解。 · 请确认枪头及离心管没有 RNase 的污染。 · 请在冰上进行细胞裂解与 RNA 稀释的操作。
文库得量比较少	纯化时有乙醇残留	<ul style="list-style-type: none"> · 洗涤磁珠时残留的乙醇会抑制后面的反应。请确保磁珠充分干燥。 · 操作房间的湿度过高时，有时磁珠的干燥会比较困难。推荐操作房间的湿度在 55% 以下。

[7] 相关产品

产品名称	容量	Code No.
Realtime PCR 分析用 cDNA 制备试剂盒 RT-RamDA™ cDNA synthesis Kit	96 次份	RMD-201
	24 次份	RMD-201T
RamDA Cell Lysis Kit	1,152 次份	RMD-301
NSR Primer Set for human	96 次份	NSR-101
NSR Primer Set for mouse	96 次份	NSR-102

产品名称	内容	Code No.
Illumina 公司 NGS 测序文库定量试剂盒 GenNext® NGS Library Quantification Kit	500 次份	NLQ-101

[8] 参考文献

1. Hayashi .T et al. Single-cell full-length total RNA sequencing uncovers dynamics of recursive splicing and enhancer RNAs. Nature Communications. 9: 619(2018)



Ideas & Chemistry

<销售商>

东洋纺（上海）生物科技有限公司

邮编：200122

邮箱：tech@bio-toyobo.cn

网址：<http://www.bio-toyobo.cn>

联系电话：021-58794900

公司地址：上海市浦东新区张杨路 500 号华润时代广场 28 楼 AL 单元

<生产商>

东洋纺株式会社敦贺生物工厂

地址：日本国福井县敦贺市东洋町 10 番 24 号