

# *TransScript*<sup>®</sup> Mouse Single Cell BCR IgG H/K Amplification Kit

## 小鼠单细胞 BCR IgG H/K 扩增试剂盒

使用前请仔细阅读说明书

版本号: Version1.0



目录号: AR201

保存: BCR TSO置于-70℃以下保存一年, 其余组分置于-18℃及其以下温度下保存一年。

### 产品说明

*TransScript*<sup>®</sup> Mouse Single Cell BCR IgG H/K Amplification Kit是一款能够以小鼠B细胞或对应细胞来源的Total RNA为模板, 特异扩增出B细胞受体IgG重链和Kappa链可变区基因。本产品适用于通量化操作, 得到的扩增产物可用于下游Sanger测序、二代NGS测序或基因克隆与表达。

### 适用范围

- 1-10<sup>3</sup>个小鼠表达BCR的B细胞。
- 杂交瘤细胞 (单个反应 < 100个细胞)。
- 10 pg - 10 ng小鼠B细胞来源的总RNA。

### 试剂盒组成

| Component                    | AR201-01 (96 rxns) |
|------------------------------|--------------------|
| BCR Lysis Buffer             | 96 µl              |
| BCR Oligo(dT)                | 192 µl             |
| 10 mM dNTPs                  | 192 µl             |
| Ribonuclease Inhibitors      | 96 µl              |
| BCR RT Buffer                | 480 µl             |
| BCR TSO                      | 96 µl              |
| BCR Reverse Transcriptase    | 192 µl             |
| 2×BCR Amplification SuperMix | 2×3.6 ml           |
| BCR cDNA Primer              | 96 µl              |
| mHeavy Primer                | 192 µl             |
| mLight Primer                | 192 µl             |
| RNase-free Water             | 2×4 ml             |

### 推荐自备试剂

- *MagicPure*<sup>®</sup> Size Selection DNA Beads (目录号: EC401)。
- 预冷1×PBS溶液, 新鲜配制的80%乙醇, 灭菌超纯水等。



## 起始样品准备

- **细胞样品准备**: 细胞收集后, 建议重悬于1×PBS中以去除培养基中的物质, 以免影响后续反应。细胞样品请保持≥90%的活性。细胞活力不高或是细胞环境不纯导致的RNA降解会使cDNA产量降低, 峰型偏小, 严重影响建库效果。
- **单细胞分选**: 将单细胞用流式分选等方式分选至已经加入裂解体系的反应孔中。分选完成后请尽早离心, 确保分选入孔的单细胞顺利进入裂解液中。因裂解液和单细胞本身自带的液体体积都很小, 立即离心可以避免入孔位置较偏的单细胞干涸在孔壁上, 从而提高建库的成功率。**单细胞分选自带的buffer体积可以忽略不计**。分选后的细胞样品可于低温条件下 (<-70℃) 保存, 干冰运输, 建议保存时间不超过半个月。
- **RNA样品准备**: 对于已提取的总RNA样品, 请用琼脂糖凝胶电泳或Agilent RNA 6000 Pico Kit等方式评价RNA完整性后再操作。RNA降解会导致cDNA产量降低, 峰型偏小, 严重影响建库效果。

## 操作步骤

### 1、细胞收集与裂解/RNA样品预处理 (于无菌条件下操作)

(1) 对于**细胞**样品, 在冰上配制如下Preserving Buffer ( 6 μl ) :

| Component               | Volume      |
|-------------------------|-------------|
| BCR Lysis Buffer        | 1 μl        |
| BCR Oligo(dT)           | 2 μl        |
| 10 mM dNTPs             | 2 μl        |
| Ribonuclease Inhibitors | 1 μl        |
| <b>Total volume</b>     | <b>6 μl</b> |

然后往细胞溶液中加入上述反应体系, 总体积最终达**11 μl**:

| Component           | Volume       |
|---------------------|--------------|
| Preserving Buffer   | 6 μl         |
| 细胞样品                | X μl*        |
| RNase-free Water    | up to 11 μl  |
| <b>Total volume</b> | <b>11 μl</b> |

轻轻混匀样品, 于PCR仪中72℃孵育3 min后, 立即置于冰上孵育2 min。然后进入第2步cDNA第一链合成反应。

\*对于需要分选的单细胞样本, 因其本身自带体积可忽略不计, 因此可以直接将单细胞分选至6μl Preserving Buffer中, 并用5 μl RNase-free Water补齐至11 μl体积。

(2) 对于**RNA**样品, 在冰上配制如下Preserving Buffer ( 5 μl ) :

| Component               | Volume      |
|-------------------------|-------------|
| BCR Oligo(dT)           | 2 μl        |
| 10 mM dNTPs             | 2 μl        |
| Ribonuclease Inhibitors | 1 μl        |
| <b>Total volume</b>     | <b>5 μl</b> |



然后往RNA溶液中加入上述反应体系，总体积最终达11  $\mu\text{l}$ ：

| Component           | Volume                             |
|---------------------|------------------------------------|
| Preserving Buffer   | 5 $\mu\text{l}$                    |
| RNA样品               | X $\mu\text{l}$                    |
| RNase-free Water    | up to 11 $\mu\text{l}$             |
| <b>Total volume</b> | <b>11 <math>\mu\text{l}</math></b> |

轻轻混匀样品，于PCR仪中72℃孵育3 min后，立即置于冰上孵育2 min。然后进入第2步cDNA第一链合成反应。

## 2、cDNA第一链合成（于超净台中操作）

(1) 在样本冰浴过程中配制一链cDNA合成Mix（总体积为9  $\mu\text{l}$ ），冰浴放置。

| Component                 | Volume                            |
|---------------------------|-----------------------------------|
| BCR RT Buffer *           | 5 $\mu\text{l}$                   |
| BCR TSO                   | 1 $\mu\text{l}$                   |
| BCR Reverse Transcriptase | 2 $\mu\text{l}$                   |
| RNase-free Water          | 1 $\mu\text{l}$                   |
| <b>Total volume</b>       | <b>9 <math>\mu\text{l}</math></b> |

\*BCR RT Buffer请于室温完全化冻，并充分涡旋混匀之后使用。

(2) 将这9  $\mu\text{l}$ 一链cDNA合成Mix加至冰浴好的样品中，用移液器轻轻混匀后瞬时离心，总体积达20  $\mu\text{l}$ 。

(3) 在PCR仪中运行如下程序（热盖90℃）。

| Temperature | Time   |
|-------------|--------|
| 42℃         | 90 min |
| 85℃         | 5 min  |
| 4℃          | Hold   |

## 3、全长cDNA扩增（于超净台中操作）

(1) 往反应完成的样品中冰上加入以下体系，扩增总体积为50  $\mu\text{l}$ 。

| Component                    | Volume                             |
|------------------------------|------------------------------------|
| 上一步反应产物                      | 20 $\mu\text{l}$                   |
| 2×BCR Amplification SuperMix | 25 $\mu\text{l}$                   |
| BCR cDNA Primer              | 1 $\mu\text{l}$                    |
| RNase-free Water             | 4 $\mu\text{l}$                    |
| <b>Total volume</b>          | <b>50 <math>\mu\text{l}</math></b> |



(2) 涡旋混匀样品，瞬时离心。在PCR仪中运行如下程序（热盖105℃）。

| Temperature | Time  | Cycle |
|-------------|-------|-------|
| 95°C        | 3 min | 1     |
| 98°C        | 20 s  | 20    |
| 60°C        | 15 s  |       |
| 72°C        | 1 min |       |
| 72°C        | 5 min | 1     |
| 4°C         | Hold  | 1     |

#### 4、IgG重、轻链基因片段扩增

(1) 冰上加入以下体系。

| Component                      | Volume |
|--------------------------------|--------|
| 上步cDNA扩增产物                     | 1 µl   |
| mHeavy Primer / mLight Primer* | 2 µl   |
| 2× BCR Amplification SuperMix  | 25 µl  |
| RNase-free Water               | 22 µl  |
| Total volume                   | 50 µl  |

\*按扩增目的，选择重链扩增引物mHeavy Primer或轻链扩增引物mLight Primer。

(2) 移液枪吹吸混匀，最后点甩离心。

(3) 在PCR仪中运行以下程序：

| Temperature | Time  | Cycle |
|-------------|-------|-------|
| 95°C        | 3 min | 1     |
| 98°C        | 15 s  | 25*   |
| 57°C        | 15 s  |       |
| 72°C        | 30 s  |       |
| 72°C        | 5 min | 1     |
| 4°C         | Hold  | 1     |

\*25个循环对于普通单B细胞或单杂交瘤细胞的H/L链扩增是足够的。但当某些单细胞扩增效果不理想时，可适当将扩增循环数加至30。

(4)对BCR重链、轻链产物进行质检或测序。可以应用琼脂糖凝胶电泳、安捷伦2100、Qsep等检测方式验证BCR重链、轻链基因片段的长度。重链PCR片段长度约为600-700 bp，轻链PCR片段长度约为600-700 bp。BCR重链、轻链产物也可进行Sanger测序或二代NGS测序鉴定。





品质高于一切  
精品服务客户

本产品仅供研究，不用于临床诊断。

版本号: V1.0-202607

服务电话 +86-10-57815020

服务邮箱 complaints@transgen.com

北京全式金生物技术股份有限公司

🌐 [www.transgen.com](http://www.transgen.com)

✉ [trans@transgen.com](mailto:trans@transgen.com)

☎ +86-400 898 0321

📍 北京市海淀区中关村东升国际科学园4号楼

