

使用『RamDA-seq™方法』从单细胞或微量RNA开始的cDNA制备试剂盒

NGS分析用的cDNA制备试剂盒

GenNext® RamDA-seq™ Single Cell Kit

Realtime PCR分析用cDNA制备试剂盒

RT-RamDA™ cDNA Synthesis Kit

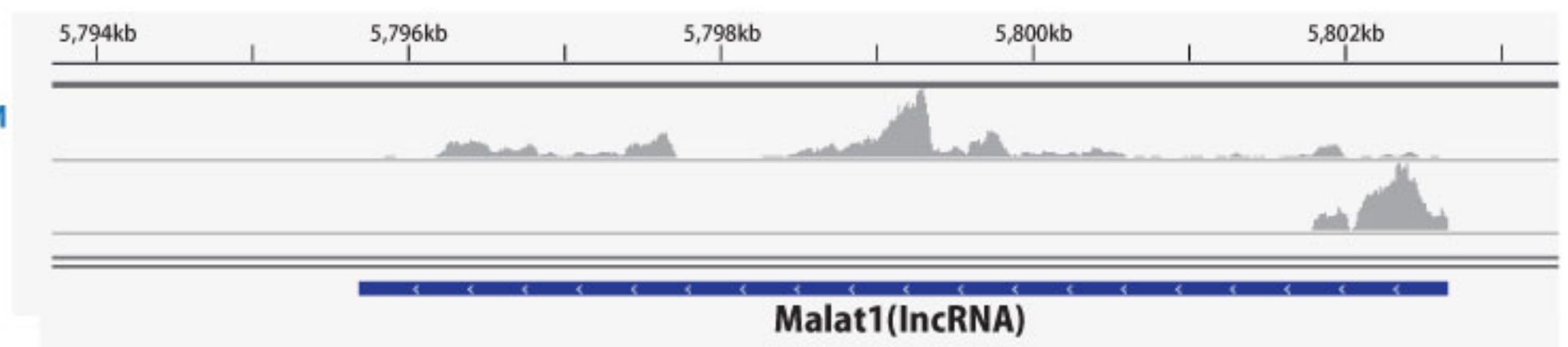
✓ 单细胞及微量RNA为模板

可使用1~100个细胞或 10pg~1ng total RNA 作为input

✓ 可制备覆盖全长RNA的cDNA

现有的只使用Oligo-dT引物的方法难以分析10kb以上的RNA，使用本产品可以制备出测序reads覆盖全长RNA的cDNA

RamDA-seq™
A公司试剂盒



✓ 除了可检测poly(A) RNA外，还可检测non-poly(A) RNA

除了Oligo-dT primer外，还使用了NSR (Not so random primer)，可检测到用现有方法无法检测的non-poly(A) RNA

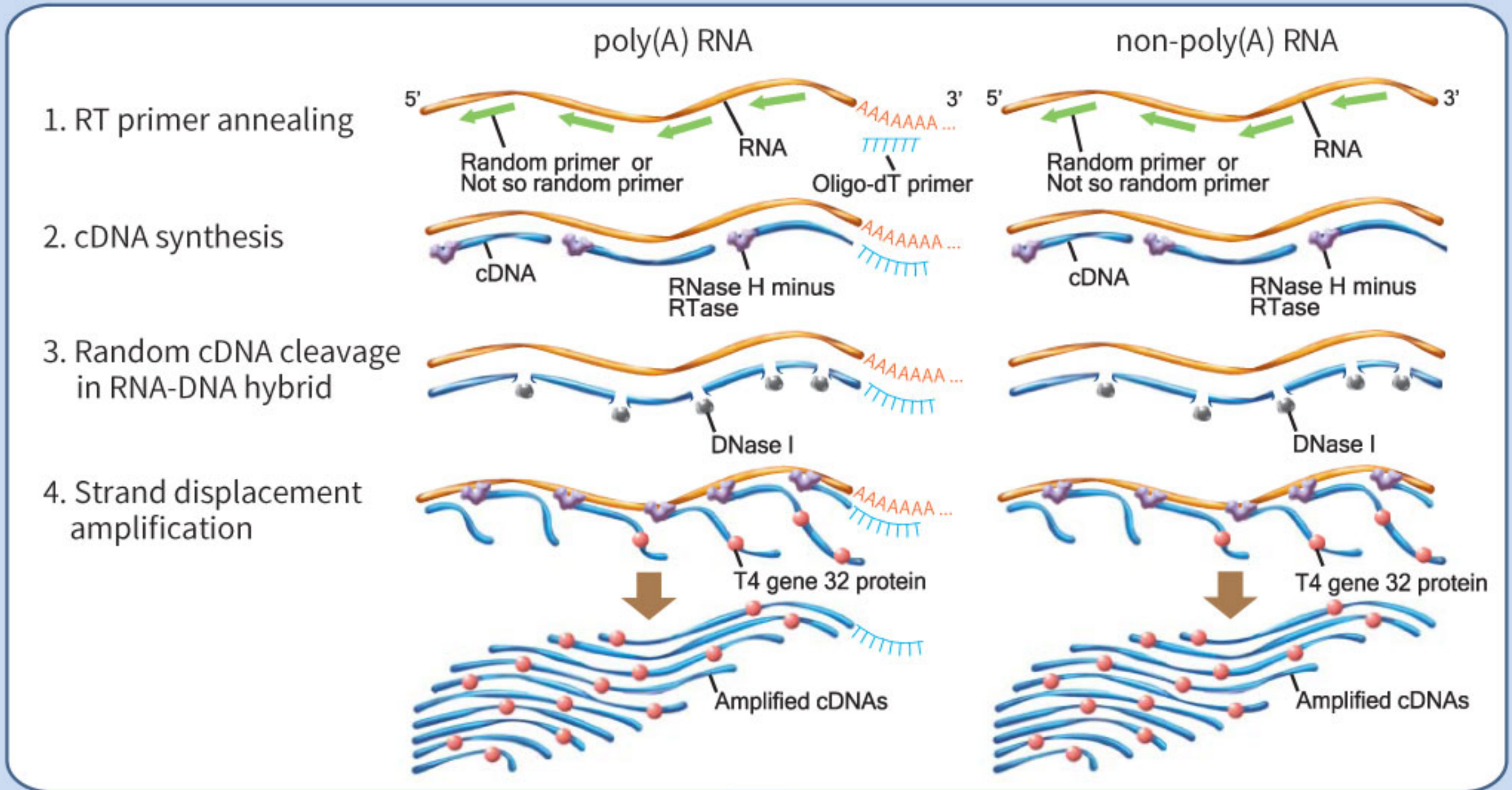
✓ 相比原来技术，检测到的基因数大大提高了

可检测组蛋白RNA、lncRNA、pre-mRNA、circRNA等各种类型的RNA

使用从Mouse ES细胞提取的RNA 10pg，分别用两种试剂盒 (N=2) 制备cDNA后，进行NGS分析

cDNA Synthesis Method	RamDA-seq™		A公司试剂盒	
Number of transcripts TPM>0.1	18,984	18,465	13,500	13,721

RamDA-seq™的原理



双链合成

NGS用文库的制备

NGS测序分析

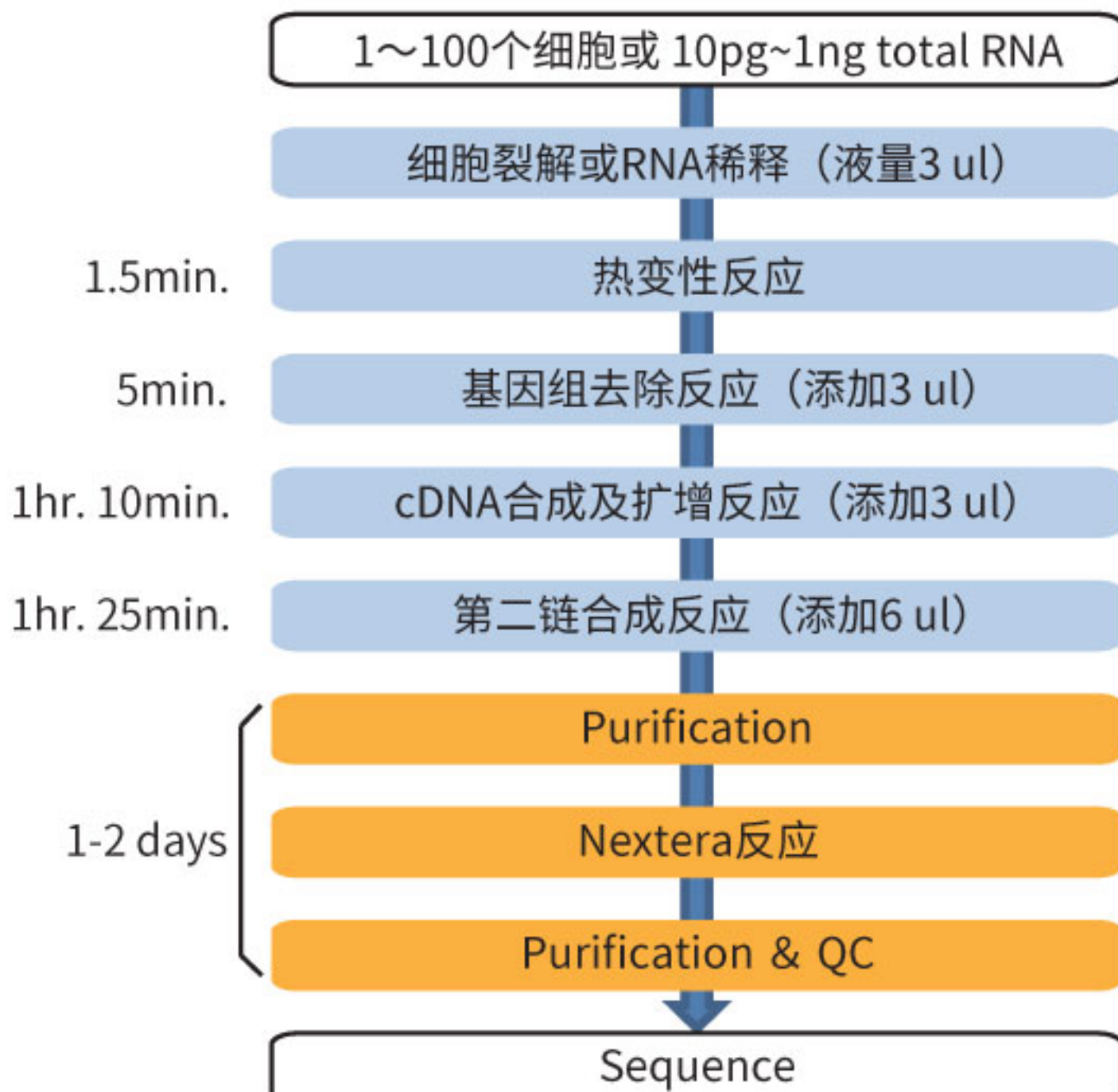
RamDA-seq™ (λ-seq) 理化研究所·生命机能科学研究中心·生物信息学研究开发小组开发的单细胞的全长total RNA测序法「Random Displacement Amplification sequencing」的简称。

现有的单细胞的RNA分析法中，因为逆转录只使用了Oligo-dT primer，所以non-poly(A) RNA不能进行逆转录，另外反应中间cDNA合成终止时，全长的检测就比较困难。另一方面，RamDA-seq™法中使用了random primer（或称作NSR primer*），所以可对poly(A)序列以外的RNA进行逆转录，non-poly(A) RNA也能够检测到。另外，这些primer与RNA的各个部位相结合，开始cDNA的合成，可得到RNA全长的测序读数。

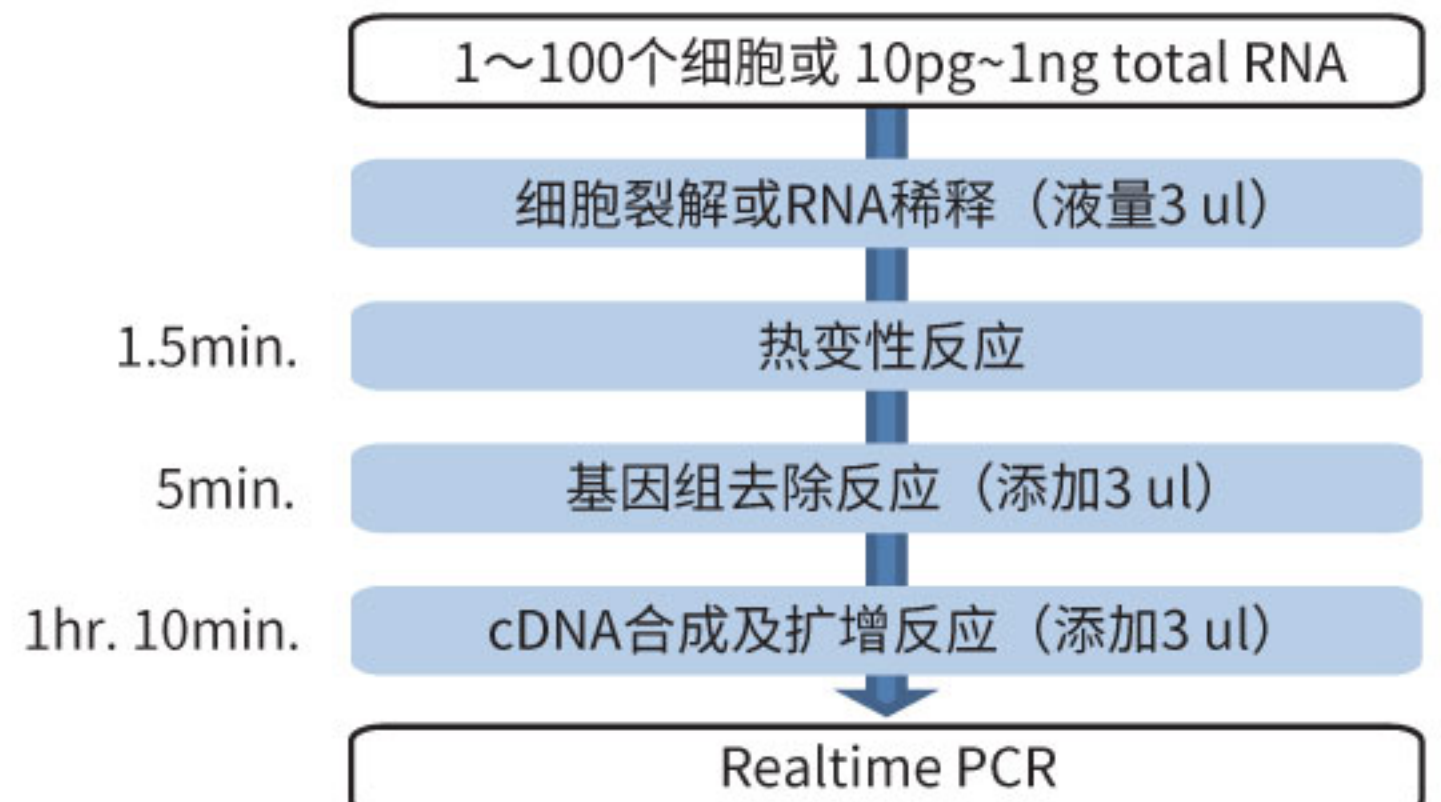
此外，RamDA-seq™法中，在cDNA合成的同时进行了扩增，无需进行原来方法中的添加扩增用adaptor或PCR反应，能够抑制扩增偏差。

*所谓NSR Primer是Not so random primer的简称，是计算上除去与18S、28S RNA基因完全匹配的序列的随机引物。通过使用NSR Primer代替random primer，可抑制rRNA合成的cDNA。

GenNext® RamDA-seq™ Single Cell Kit



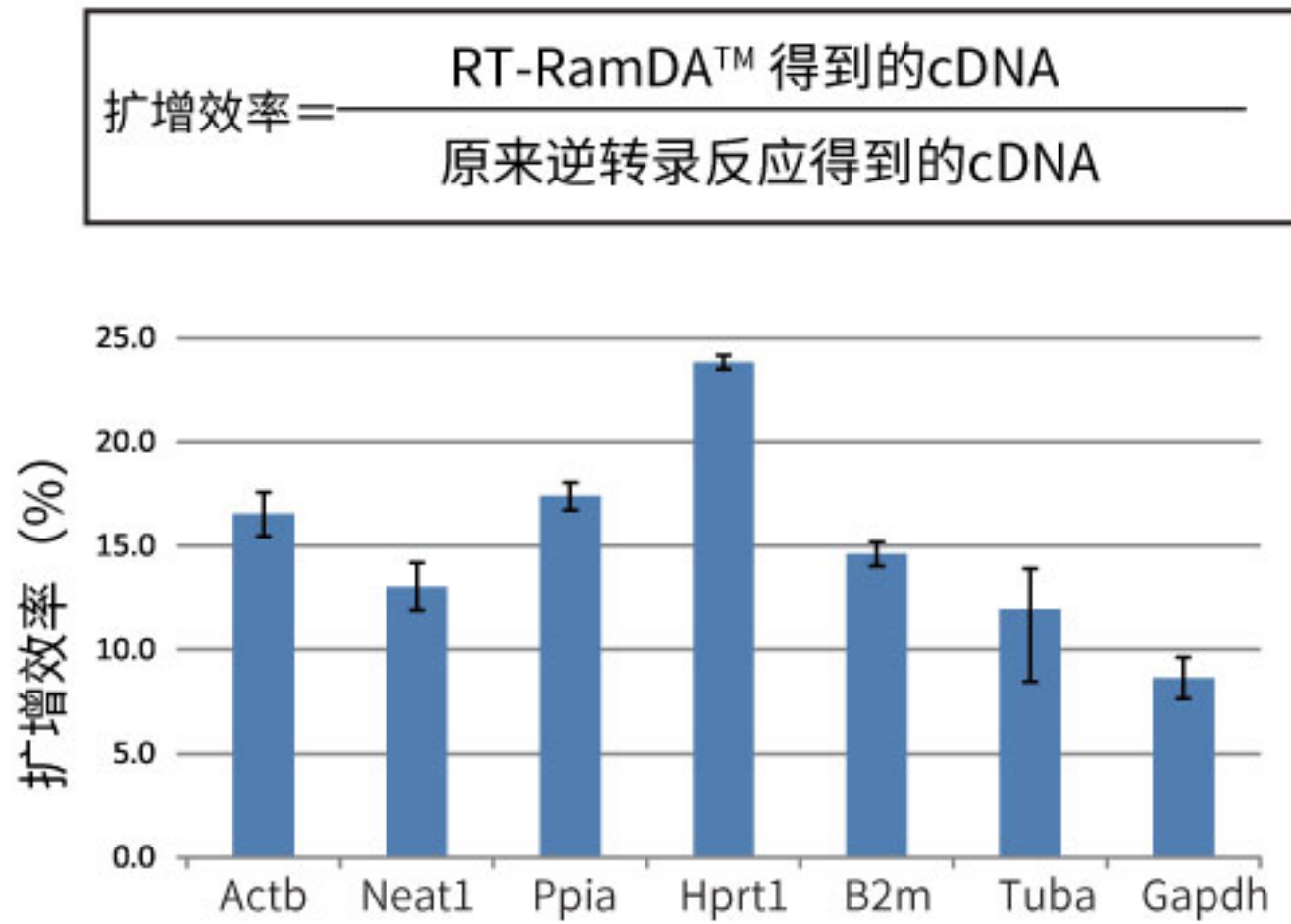
RT-RamDA™ cDNA Synthesis Kit



除了本试剂盒，还需要磁珠试剂Agencourt AMPure XP(Beckman Coulter)及文库制备试剂Nextera XT DNA Sample Preparation Kit(illumina).

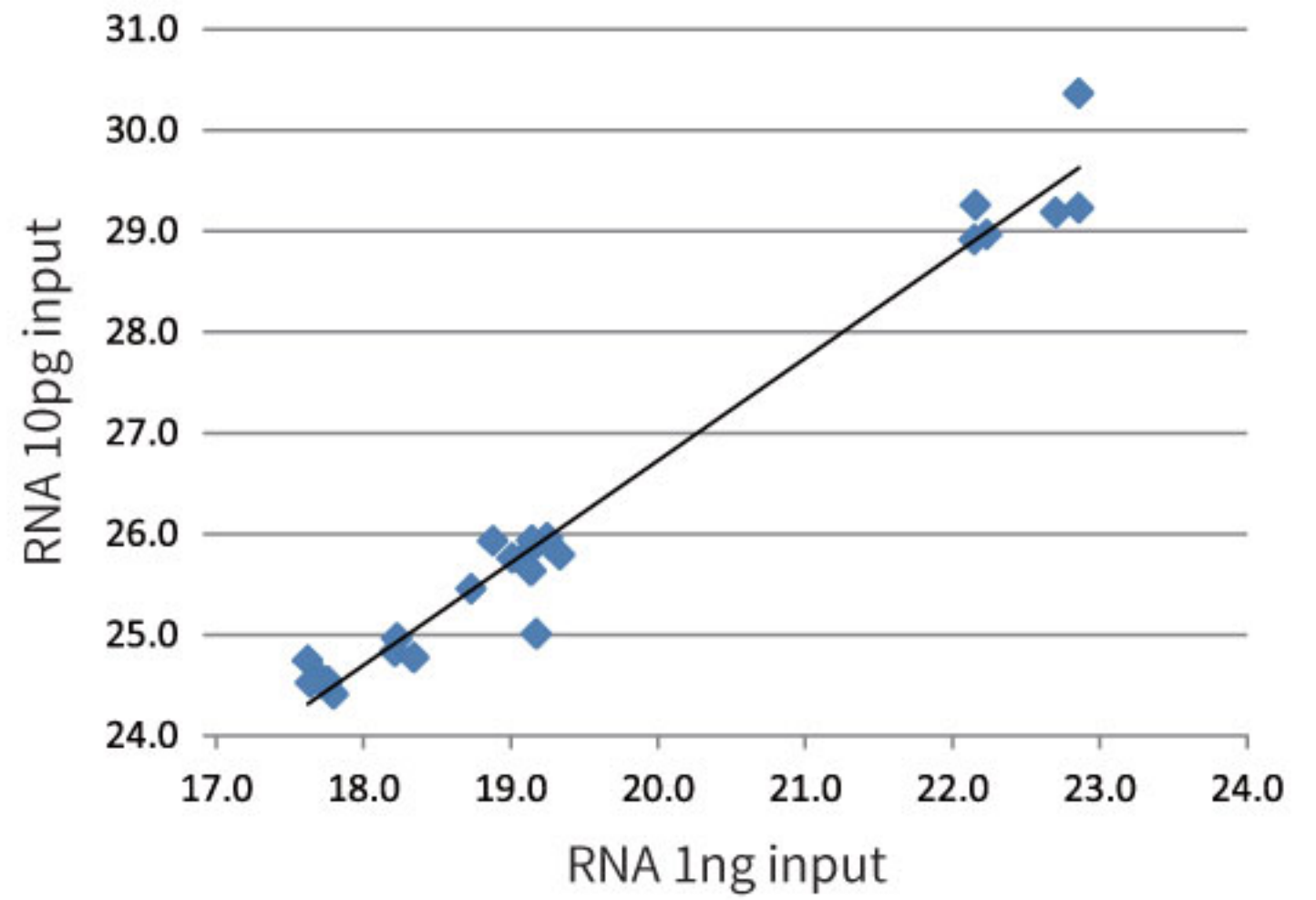
实验例1 cDNA扩增效率的验证

由NIH3T3 Total RNA 10pg开始, 分别用以前的试剂及RT-RamDA™ cDNA Synthesis Kit制备cDNA, 通过qPCR测定基因。结果显示, RT-RamDA™ cDNA Synthesis Kit得到的cDNA量是以前试剂得到的cDNA量的9倍以上。



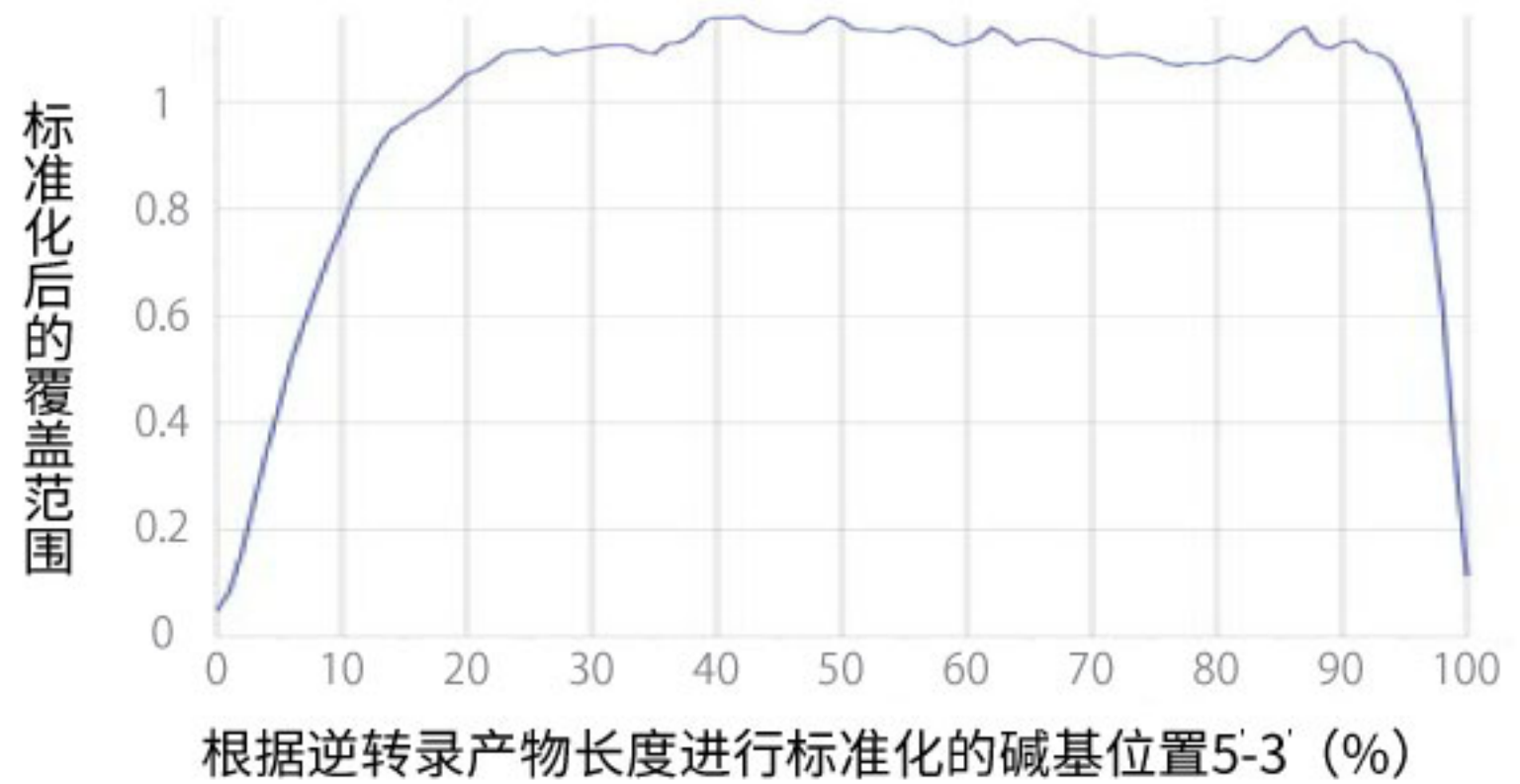
实验例2 输入RNA量的验证

分别使用10pg和1ng NIH3T3 Total RNA, 用RT-RamDA™ cDNA Synthesis Kit制备cDNA, 通过qPCR比较8个基因(N=3)的Ct值。结果显示, 10pg的输入量和1ng的输入量具有高度相关性、微量的输入量也可制备cDNA。



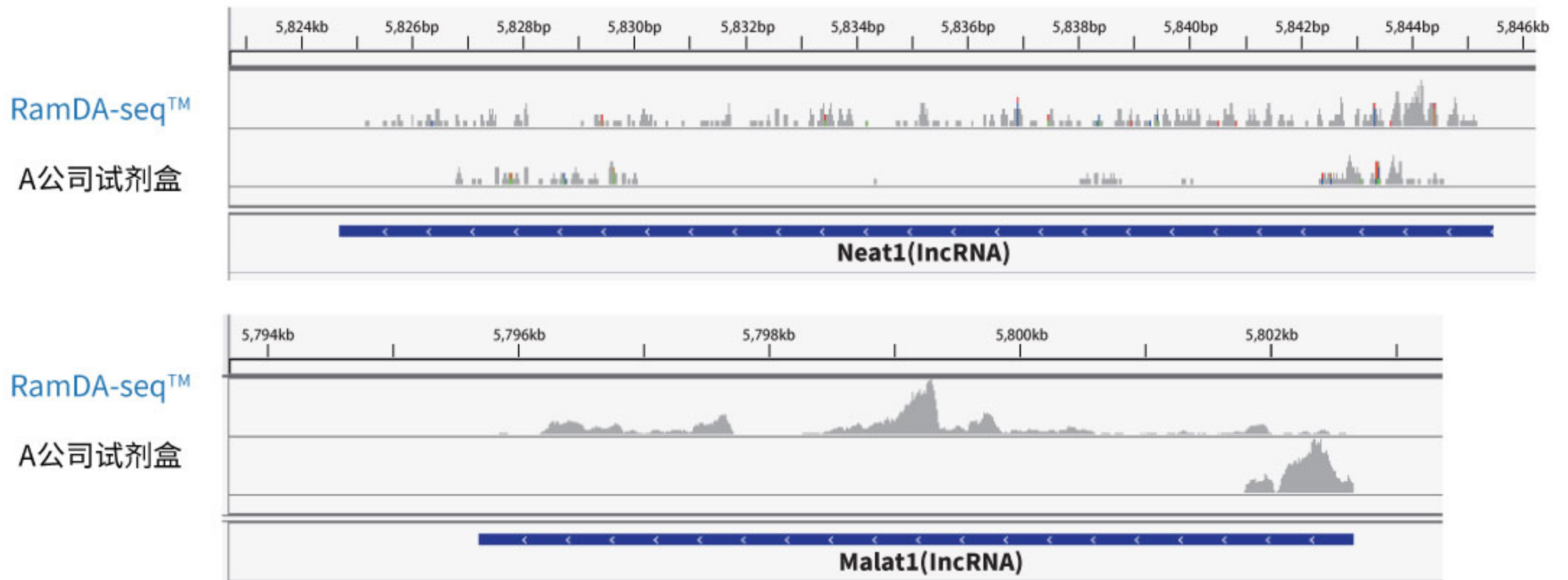
实验例3 覆盖范围均一性的验证

以10pg mES total RNA开始, 使用GenNext® RamDA-seq™ Single Cell Kit制备cDNA、双链DNA, 进行NGS分析。NGS分析使用illumina MiSeq仪器。结果显示, 制备的文库基本覆盖了全部基因。



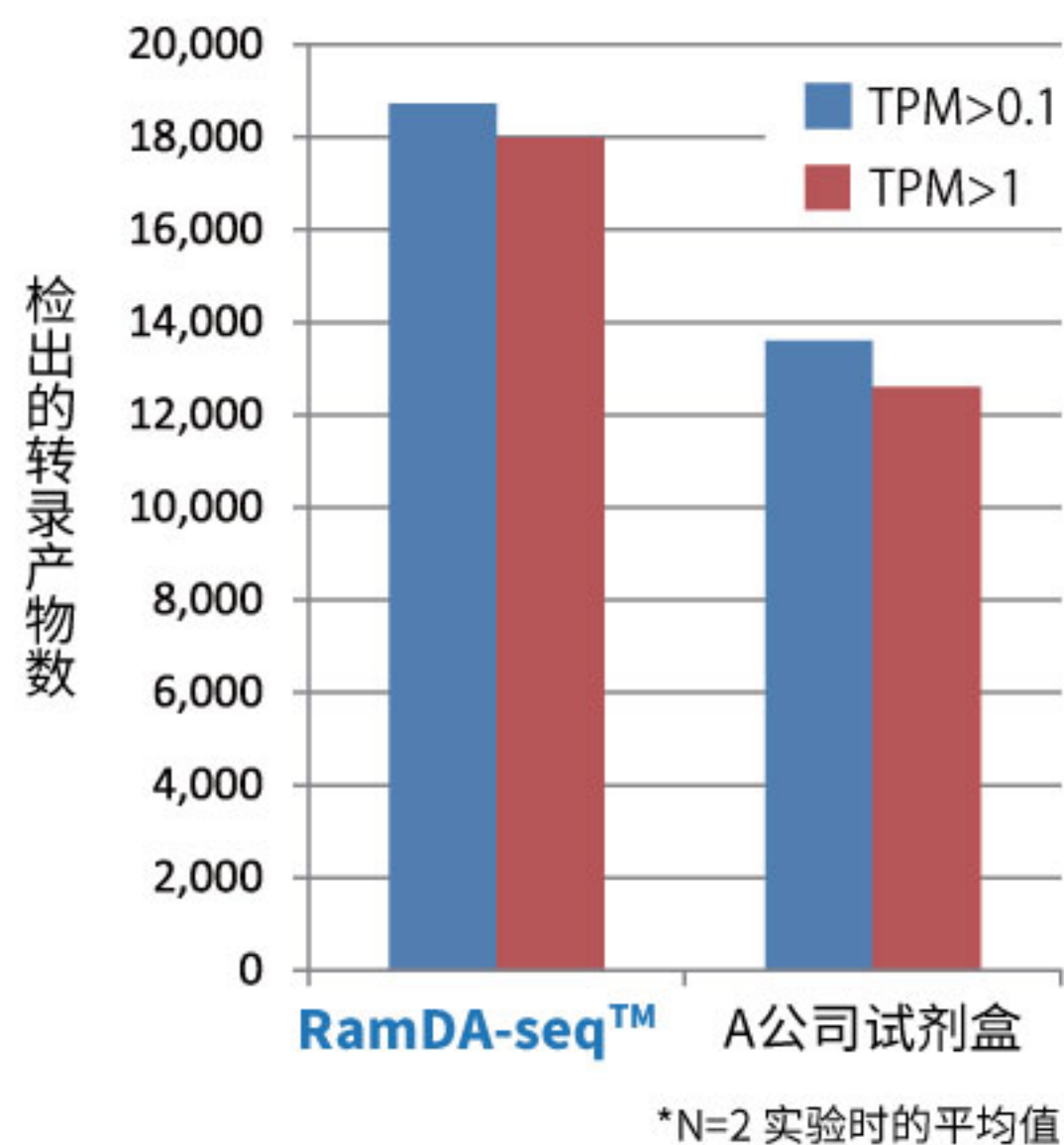
实验例4 由长链RNA制备cDNA的比较

以10pg mES total RNA开始, 使用GenNext® RamDA-seq™ Single Cell Kit及A公司的试剂盒制备cDNA、双链DNA, 进行NGS分析。NGS分析使用illumina MiSeq仪器。结果显示: 使用GenNext® RamDA-seq™ Single Cell Kit可以检测到用A公司的试剂盒检测困难的Neat1及Malat1这样的lncRNA或在全长范围内进行检测。



实验例5 检测基因数的比较及不同RNA种类Read数的验证

以10pg mES total RNA开始,使用GenNext® RamDA-seq™ Single Cell Kit及A公司的试剂盒制备cDNA、双链DNA,进行NGS分析。GenNext® RamDA-seq™ Single Cell Kit中使用的是小鼠用NSR引物对。GenNext® RamDA-seq™ Single Cell Kit不需要进行cDNA扩增,而A公司的试剂盒进行了18个循环的PCR扩增。之后,使用Nextera XT DNA Sample Preparation Kit进行文库制备,用illumina MiSeq仪器进行NGS测序。结果显示:与A公司的试剂盒相比,GenNext® RamDA-seq™ Single Cell Kit可以检测到大约5000个以上的基因。



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。

价格表

产品名称	包装	保存温度	货号	价格
NGS分析用的cDNA制备试剂盒 GenNext® RamDA-seq™ Single Cell Kit ^{*1} · 细胞裂解试剂 · RT-RamDA™ 试剂 · 第2链合成试剂	24 次份	-20°C	RMD-101T	¥ 15,000
	96 次份	-20°C	RMD-101	¥ 53,000
Realtime PCR分析用cDNA制备试剂盒 RT-RamDA™ cDNA Synthesis Kit · 细胞裂解试剂 · RT-RamDA™ 试剂	24 次份	-20°C	RMD-201T	¥ 7,500
	96 次份	-20°C	RMD-201	¥ 26,500
RT-RamDA™ Cell Lysis Kit ^{*2} · 细胞裂解试剂	1,152 次份	-20°C	RMD-301	¥ 2,000
NSR Primer Set for human ^{*3}	96 次份	-20°C	NSR-101	¥ 3,000
NSR Primer Set for mouse ^{*4}	96 次份	-20°C	NSR-102	¥ 3,000

*1: 本产品中不含有文库制备试剂和磁珠。另外, 虽然含有RT-RamDA™ Primer Mix (Oligo-dT primer 和Random primer), 但不含有NSR Primer, 所以请使用另外销售的Code No. NSR-101、NSR-102。*2: 是Code No. RMD-101, 101T, 201, 201T中含有的细胞裂解试剂的大包装型。*3: 人用的NSR。*4: 小鼠用的NSR。



东洋纺(上海)生物科技有限公司

上海市浦东新区张杨路500号华润时代广场28楼AL单元

电话: 021-5879-4900

传真: 021-5879-4901



TOYOBO (Shanghai) Biotech Co.,Ltd.

Room AL, Floor 28, TIMES SQUARE, No.500,

Zhangyang Rd. Pudong, Shanghai, 200122

TEL :021-58794900 FAX:021-58794901

