

Code No. 3734

研究用

Takara

CellAmp™ Whole Transcriptome
Amplification Kit (Real Time) Ver.2

说明书

目 录

内 容	页 码
● 制品说明	1
● 制品内容	1
● 试剂盒外必备主要试剂和仪器	1
● 保 存	1
● 使用注意	1
● 操作方法	2
● 实验例	4
● 参考文献	6
● 关联产品	7

● 制品说明

本制品是从少数细胞直接反转录合成cDNA，然后对反转录的cDNA进行扩增的试剂盒。扩增的cDNA可以作为Real Time PCR的模板使用。通常情况下，微量核酸提取时，纯化过程中核酸会有所损失，使用本制品不需要对细胞RNA和反转录的cDNA进行纯化，即可对反转录的cDNA高效扩增。

使用本试剂盒首先溶解细胞，然后使用dT Adaptor Primer (RT dT Primer 2) 进行反转录反应，由mRNA合成cDNA，通过TdT酶对合成的cDNA进行dA加尾反应后，以此作为模板进行PCR反应扩增cDNA。

本试剂盒除了能从少数细胞直接进行cDNA扩增外，也可以对微量的RNA进行cDNA扩增。

本试剂盒还添加了Exonuclease I的处理步骤，能够抑制引物的非特异性扩增，并且提高低表达水平基因的扩增产量。

● 制品内容 (5 μ l 反应体系, 100 次量)

1. Lysis Buffer (4X)	150 μ l
2. Recombinant RNase Inhibitor (40 U/ μ l)	30 μ l
3. RT dT Primer 2	12 μ l
4. dNTP Mixture (2.5 mM each)	12 μ l
5. MgCl ₂ (22.5 mM)	36 μ l
6. RT Enzyme Mix 2 *1	36 μ l
7. Exonuclease I (5 U/ μ l)	72 μ l
8. TdT Buffer (5X)	144 μ l
9. dATP (90 mM)	24 μ l
10. TdT Enzyme Mix *2	54 μ l
11. PCR Primer Mix 2	300 μ l
12. RNase Free dH ₂ O	1 ml

*1: 含有 PrimeScript Reverse Transcriptase、RNase Inhibitor。

*2: 含有 Terminal Deoxynucleotidyl Transferase、RNase H。

● 试剂盒外必备主要试剂和仪器

DNA Polymerase

TaKaRa Ex Taq[®] Hot Start Version (Code No. RR006A/B)

1.5 ml microtube

0.2 ml microtube

微量移液器及枪头

Phosphate-buffered saline (PBS)

PCR 扩增仪

TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice™ Gradient (Code No. TP600)

TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice *Touch* (Code No. TP350)等

● 保 存: -20°C。

● 使用注意

- 1) 为了保证反应液配制的准确性，进行各项反应时，应先按反应数+1 的量配制 Master Mix，然后再分装到每个反应管中。因为反应体系比较小，建议每次反应至少要配置 5 个反应以上的 Master Mix。
- 2) 各步反应结束后，反应管应置于冰上，轻微离心后再进行下一步操作。

3) 请使用 0.2 ml 的 microtube 和 PCR 仪进行反应。

● 操作方法

◆ 从细胞直接进行 cDNA 合成的操作方法

- ① 准备细胞悬液，反应起始细胞数低于 1000 个细胞。除去细胞培养基，用 PBS 洗净后重悬于 PBS 中。
- ② 除细胞悬液外，依照如下组份先按反应数+1 的量配制 Master Mix，取配制好的 Master Mix 分装到 0.2 ml 反应管中后，各加入 0.5 μ l 细胞悬液。

试剂	使用量 (一个反应)
Lysis Buffer	1.25 μ l
Recombinant RNase Inhibitor	0.25 μ l
RT dT Primer 2	0.1 μ l
dNTP Mixture	0.1 μ l
Cell Solution*1	0.5 μ l
RNase Free dH ₂ O	up to 5 μ l

*1: 细胞悬液最多可以加入 0.5 μ l，最多可以加入的细胞数为 1000 个。

- ③ 70°C 保温 1.5 min，使细胞溶解。
- ④ 向③的反应管中加入以下组份进行 cDNA 的合成反应。除③的反应液外，其它各组份应先按反应数+1 的量配制 Master Mix，然后向③的每个反应管中加入 0.6 μ l 配好的 Master Mix。

试剂	使用量
③的反应液	5 μ l
MgCl ₂	0.3 μ l
RT Enzyme Mix 2	0.3 μ l
Total	5.6 μ l

- ⑤ 按以下条件进行 cDNA 的合成反应。
42°C 5 min
85°C 5 sec
- ⑥ 向⑤的反应管中加入 0.6 μ l Exonuclease I，全量 6.2 μ l。按如下条件进行 Exonuclease I 处理。
37°C 15 min
80°C 15 min
- ⑦ 向⑥的反应管中加入以下组份进行 Poly (A) 的加尾反应。除⑥的反应液外，其它各组份配制 Master Mix，然后向⑥的每个反应管中加入 6 μ l 配制好的 Master Mix。

试剂	使用量
⑥的反应液	6.2 μ l
TdT Buffer	1.2 μ l
dATP	0.2 μ l
TdT Enzyme Mix	0.45 μ l
RNase Free dH ₂ O	4.15 μ l

- ⑧ 按以下条件进行 Poly (A) 的加尾反应。
37°C 15 min
70°C 10 min
- ⑨ 配制下列 cDNA 扩增反应液。除⑧的反应液外，其它各组份应先按反应数+1 的量配制 Master Mix，

取 22.5 μl 配制好的 Master Mix 分装到新的 0.2 ml 反应管中，然后加入 2.5 μl 上述⑧的反应液。

试剂	使用量
⑧的反应液	2.5 μl
10X <i>Ex Taq</i> Buffer*2	2.5 μl
dNTP Mixture (2.5 mM each) *2	2.5 μl
PCR Primer Mix 2	0.75 μl
<i>TaKaRa Ex Taq</i> HS (5 U/ μl) *2	0.25 μl
RNase Free dH ₂ O	Up to 25 μl

*2: *TaKaRa Ex Taq* Hot Start Version (Code No. RR006A) (本试剂盒中不提供)。

⑩ 按以下条件进行 cDNA 的扩增反应。

95°C	1 min	} 1 Cycle
50°C	1 min	
72°C	3 min	
95°C	30 sec	} 20 Cycles
67°C	1 min	
72°C	3 min	
72°C	10 min	

扩增的 cDNA 可以按 10、100 倍稀释后作为 Real Time PCR 模板使用。cDNA 添加量根据目的基因表达量不同可以适当调整。扩增得到的 cDNA 若不立即使用，请于 -20°C 保存。

(使用本产品扩增的 cDNA 进行 real-time PCR 的注意事项)

设计 Real Time PCR Primer 时，应在 mRNA 3' 端的 1 kb 以内进行设计。这样可以保证以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增时的均一性。不建议在距离 mRNA 3' 端更远的区域内进行引物设计。

◆ 从 Total RNA 起始进行 cDNA 合成的操作方法

① 按下列组份配制反转录反应液。除 Total RNA 外，其它各组份应先按反应数+1 的量配制 Master Mix，取配制好的 Master Mix 5.1 μl 分装到 0.2 ml 反应管中后，加入 0.5 μl Total RNA，总量为 5.6 μl 。

试剂	使用量
Lysis Buffer	1.25 μl
MgCl ₂	0.3 μl
RT Enzyme Mix 2	0.3 μl
RT dT Primer 2	0.1 μl
dNTP Mixture	0.1 μl
Total RNA*3	0.5 μl
RNase Free dH ₂ O	Up to 5.6 μl

*3: Total RNA 最大加入量为 20 ng。

② 按以下条件进行 cDNA 的合成反应。

42°C	5 min
85°C	5 sec

③ 以下操作参照“从细胞直接进行 cDNA 合成的操作方法”中的⑥开始的各操作步骤。

● 实验例

1. 从微量 Total RNA 起始进行 cDNA 合成

按照本制品(Code No. 3734, Ver. 2 kit) 或 CellAmp Whole Transcriptome Amplification Kit (Real Time) (Code No. 3730)的操作方法, 使用从 HeLa 细胞中获得的 Total RNA (20 pg、200 pg、2 ng、20 ng) 作为起始材料进行 cDNA 扩增, 将扩增得到的 cDNA 取 5 μ l 进行电泳, 电泳结果见图 1。

另外, 将扩增得到的 cDNA 10 倍稀释后 (或者 40 倍稀释), 取 2 μ l 作为 Real Time PCR 的模板, 进行 Real Time PCR 反应, 扩增结果见图 2。

所有的 Real Time PCR 实验都使用 TB Green[®] Premix Ex Taq II (Perfect Real Time), 反应体积为 25 μ l。

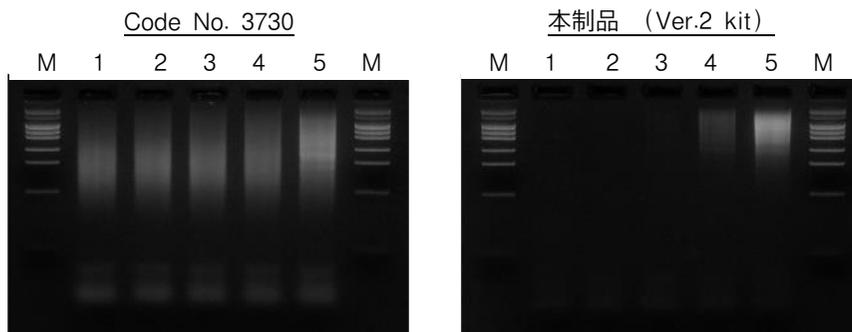


图 1 不同浓度模板的 cDNA 扩增比较。取 5 μ l 扩增产物进行 3% NuSieve™ 3:1 Agarose 凝胶电泳图谱

Lane 1: No template control

2: HeLa total RNA 20 pg

3: HeLa total RNA 200 pg

4: HeLa total RNA 2 ng

5: HeLa total RNA 20 ng

M: pHY Marker 200ng

从图 1 中可以看出, Code No. 3730 得到的 cDNA 扩增产物电泳有 smear, 甚至无模板的阴性对照也出现了 smear, 可能是引物发生了非特异性扩增。而使用本试剂盒进行操作的结果显示, 片段的强度与模板的添加量有关, 其中存在目的 cDNA 的扩增产物。

图 2A 10 倍稀释的 cDNA 扩增产物作为模板

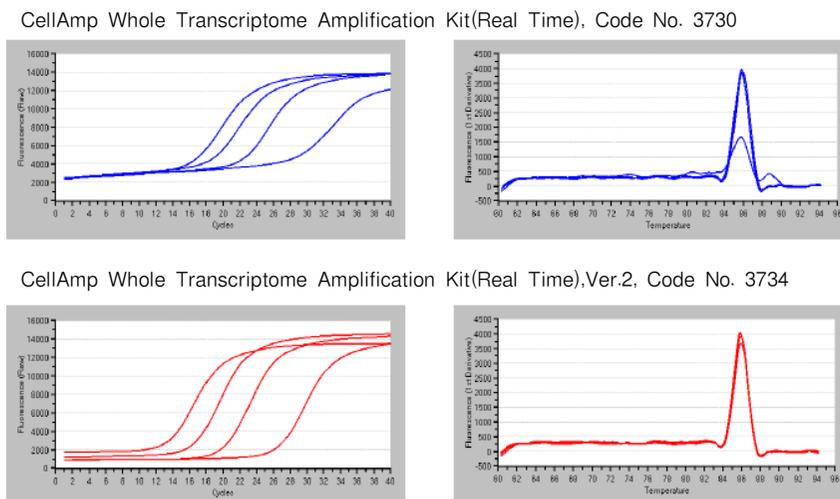


图 2B 40 倍稀释的 cDNA 扩增产物作为模板

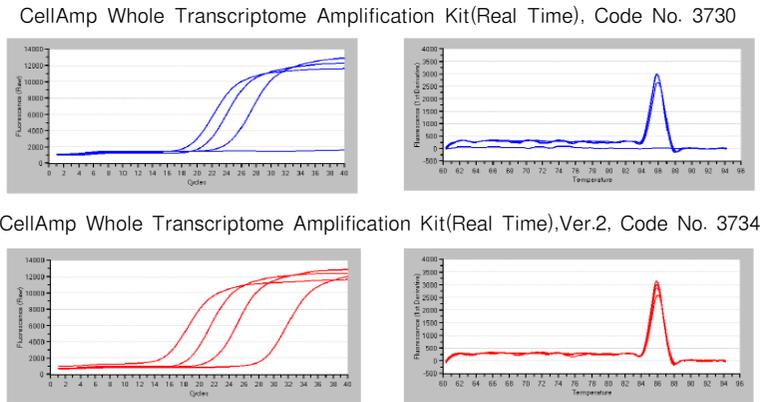
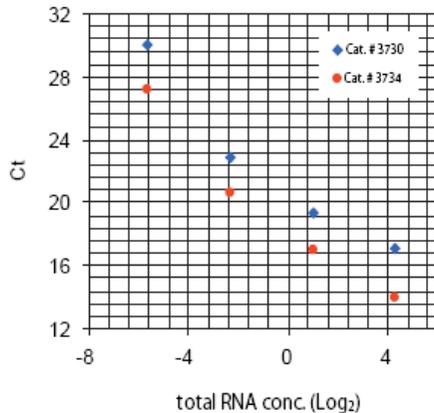


图 2 为 human GAPDH 进行 real-time PCR 的检测结果。以 10 倍稀释的 cDNA 为模板时 (图 2A), 使用 Code No. 3730 处理的结果本底增高, 而使用本试剂盒处理的结果本底较低。在以 40 倍稀释的 cDNA 为模板时 (图 2B), 使用 Code No. 3730 获得的产物也很容易检测到目的基因。从图 2C 中对 Ct 值的比较结果可知, 本试剂盒具有很高的扩增效率。

图 2C 10 倍稀释 cDNA 的 Ct 值比较



装置: Thermal Cycler Dice Real Time System
试剂: TB Green Premix Ex Taq II (Perfect Real Time)
目的基因: Human GAPDH

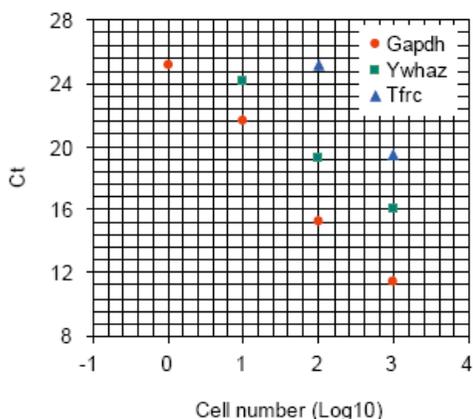
2. 从细胞起始进行 cDNA 合成

[方法]

将小鼠3T3细胞 (2×10^6 cells/ml) 用PBS悬浮后梯度稀释成2, 20, 200, 2000 cells/ μ l, 取0.5 μ l 进行cDNA的扩增。合成的cDNA产物10倍稀释后取2 μ l进行Real Time PCR反应。

[结果]

由图 3 的 Real Time PCR 结果显示, 选取表达量不同的 3 种基因进行检测, 对于表达量高的 GAPDH 基因, 在 1~1000 细胞数范围内都得到很好的检测结果。比 GAPDH 表达量低的 Ywhaz 基因和 Tfrc 基因分别在 10~1000、100~1000 细胞数范围内都得到检测结果。以上结果表明, 检出不同基因需要的细胞数范围根据检测基因的表达量不同而不同。另外, 由于细胞种类的不同, 每个反应添加的细胞数也有可能变化。



装置: Thermal Cycler Dice Real Time System
 试剂: TB Green *Premix Ex Taq* (Perfect Real Time)
 目的基因: Mouse *GAPDH*, *Ywhaz*, *Tfrc*

图 3: 以不同细胞数起始, 各基因的 Real Time PCR 解析结果

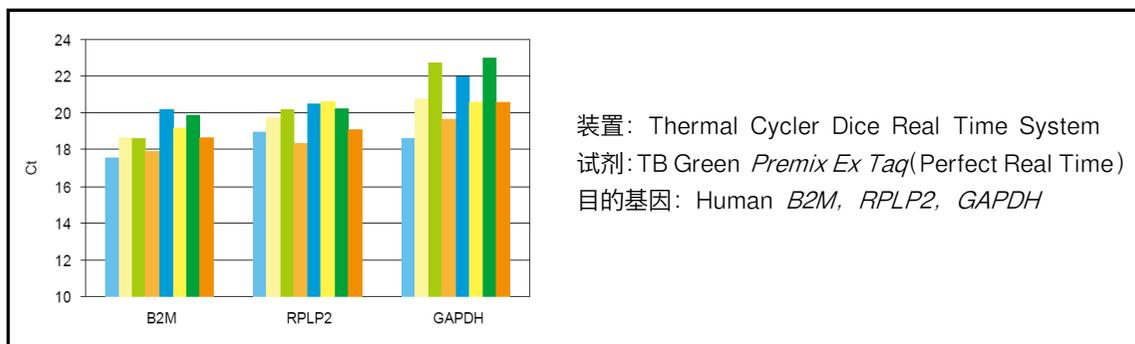
3. 从单一细胞起始进行 cDNA 合成

[方法]

预先在 0.2 ml 反应管中加入 Lysis buffer 后放在冰上。用毛细吸管分离出 8 个单一的 HeLa 细胞, 并将每一个细胞分别加入到分装了 Lysis buffer 的反应管中。然后使用本制品进行 cDNA 的扩增, 得到的 cDNA 稀释后取 2 μ l 进行 Real Time PCR 反应。

[结果]

由图 4 Real Time PCR 结果显示, 由 8 个单一的 HeLa 细胞分别进行扩增, 得到的 cDNA 进行 Real Time PCR 反应, 检测的各目的基因都得到检出。各基因各样品间的检测结果稍有不同, 但是各样品间的 3 个基因变化的趋势是相同的。此结果也许反映了各样品 mRNA 含量的不同。



装置: Thermal Cycler Dice Real Time System
 试剂: TB Green *Premix Ex Taq*(Perfect Real Time)
 目的基因: Human *B2M*, *RPLP2*, *GAPDH*

图 4: 单一细胞起始的 cDNA 扩增

● 参考文献

- 1) Kurimoto K, *et al.* Global single-cell cDNA amplification to provide a template for representative high-density oligonucleotide microarray analysis. Kurimoto K, Yabuta Y, Ohinata Y, Saitou M. *Nature Protocol.* (2007) **2**(3): 739-752.
- 2) Brady G and Iscove NN. Construction of cDNA libraries from single cells. *Methods Enzymol.* (1993) **225**: 611-623.

● 关联产品

TB Green® *Premix Ex Taq*™ II (Tli RNase H Plus) (Code No. RR820A/B)*
Probe qPCR Mix (Code No. RR391A/B)
Thermal Cycler Dice™ Real Time System III (Code No. TP950/TP970/TP980/TP990)
TaKaRa Ex Taq™ Hot Start Version (Code No. RR006A/B)
TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice™ Gradient (Code No. TP600)
TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice™ *Touch* (Code No. TP350)

* 现已将 Takara Bio 的嵌合法 real-time PCR (qPCR) 产品名称变更为“TB Green series”。本次只变更产品名称，产品 Code 和产品性能不受变更影响，可以与以往产品同样使用。

TaKaRa Ex Taq and TB Green are registered trademarks of Takara Bio Inc.
CellAmp, PrimeScript, *Premix Ex Taq*, and Thermal Cycler Dice are trademarks of Takara Bio Inc.

注意

本产品仅供科学研究使用，不能用于人、动物的医疗或诊断程序，不能使用本产品作为食品、化妆品或家庭用品等。

未经 Takara Bio Inc. 书面许可授权或批准，不得制造、许诺销售、销售、进口 Takara 产品，或者使用 Takara 产品所有的相关专利及相关商标。

如果您需要其他用途的许可授权，请联络我们，或访问我们网站 www.takarabio.com。

您使用本产品必须遵守产品网页上适用的全部许可要求。阅读、了解并遵守此类声明的所有限制性条款是您的责任。

所有商标均属于各自商标所有者的财产。某些商标并未在全部行政区注册。

本文件由宝日生物技术（北京）有限公司翻译制作，最新版本文件请参考 Takara Bio Inc. 网站。为正确使用 Takara 产品，您应当掌握本产品的相关知识和使用说明。

技术咨询热线：

0411-87641685, 87641686

4006518761, 4006518769

TAKARA BIO INC.

URL: <https://www.takarabiomed.com.cn>

v202312Da