

TaKaRa Code : D3734

**CellAmp® Whole Transcriptome
Amplification Kit (Real Time)Ver.2
(100 次量)**

说明书

宝生物工程(大连)有限公司

目 录

内 容	页 码
• 制品说明	1
• 制品内容	1
• 保 存	1
• 操作注意	1
• 操作方法	1
◆从细胞直接进行 cDNA 合成的操作方法	1
◆从 Total RNA 起始进行 cDNA 合成的操作方法	3
• 使用例	3
• 相关产品	5

● 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，进行微量核酸提取时，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。

使用本制品首先溶解细胞，然后使用dT Adaptor Primer (RT dT Primer) 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。

本制品除了能从极少数细胞直接进行cDNA扩增外，也可以对微量的RNA进行cDNA扩增。

● 制品内容 (5 µl 反应体系 , 100 次量)

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

*1 : 含有 PrimeScript Reverse Transcriptase、RNase Inhibitor。

*2 : 含有 Terminal Deoxynucleotidyl Transferase、RNase H。

● 保 存 : -20°C。

● 操作注意

- 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，反应管放在冰上冷却，轻微离心后再进入下一步操作。
- 3) 请使用 0.2 ml 的 Microtube 和 PCR 仪进行反应。

● 操作注意

◆ 从细胞直接进行 cDNA 合成的操作方法

- ① 按下列组份配制细胞溶解液。除 Cell Solution 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 分装到 0.2 ml 反应管中后，加入 0.5 µl Cell Solution。

试剂	使用量
Lysis Buffer	1.25 µl
RNase Inhibitor	0.25 µl
RT dT Primer 2	0.1 µl
dNTP Mixture	0.1 µl
Cell Solution*1	0.5 µl
RNase Free dH ₂ O	up to 5 µl

*1 : Cell Solution 最多可以加入 0.5 µl，可以最多加入的细胞数为 1000 个。

Cell Solution 为去除细胞培养基后，用 PBS (-) 洗净后，用 PBS (-) 等悬浮的细胞液。

- ② 70°C 1.5 min, 使细胞溶解。
- ③ 向②的反应管中加入以下组份进行 cDNA 的合成反应。除②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②的每个反应管中加入 0.6 μ l 配好的 Master Mix。

试剂	使用量
②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

- ④ 按以下条件进行 cDNA 的合成反应。
- 42°C 5 min
85°C 5 sec
- ⑤ 向④的反应管中加入 0.6 μ l Exonuclease I, 总量 6.2 μ l。
- ⑥ 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) 的附加反应。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) 的附加反应。
- 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 μ l 配制好的 Master Mix 分装到新的 0.2 ml 反应管中, 然后加入 2.5 μ l 上述⑧的反应液。

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

*2 : *TaKaRa Ex Taq*[®] Hot Start Version (*TaKaRa* Code : DRR006)

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，得到的 cDNA 不立即使用时请于 -20°C 保存。

〔注意〕设计 Real Time PCR Primer 时，应在 mRNA 3' 端的 1 kb 以内进行设计。使用本制品时，为了保证 cDNA 进行 PCR 扩增时的均一性，合成的 1st Strand cDNA 长度要适度。

◆ 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。

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③以后的各操作步骤。

● 使用例

1. 从 Total RNA 起始进行 cDNA 合成

按照本制品的操作方法，使用 HeLa 细胞由来的 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 μl 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 μl 作为 Real Time PCR 的模板，进行 Real Time PCR 反应，扩增结果见图 2。

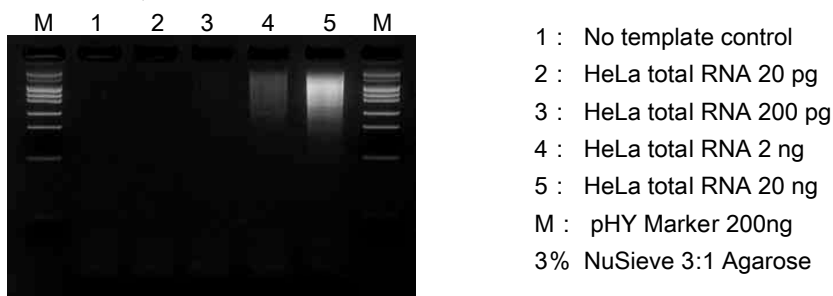
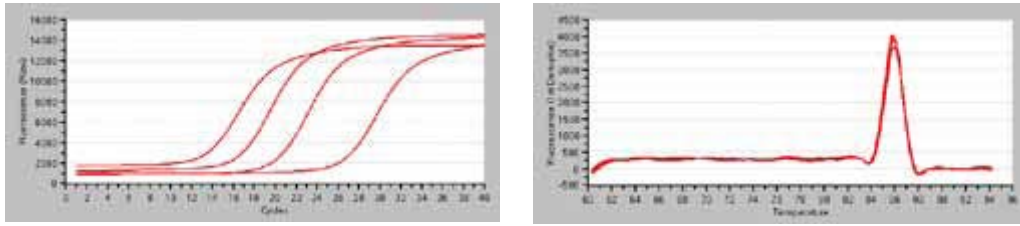


图 1 : cDNA 扩增产物 5 μl 电泳

A：将扩增得到的 cDNA 10 倍稀释后作为模板进行 Real Time PCR 反应，扩增 Human GAPDH 基因。



B：将扩增得到的 cDNA 40 倍稀释后作为模板进行 Real Time PCR 反应，扩增 Human GAPDH 基因。

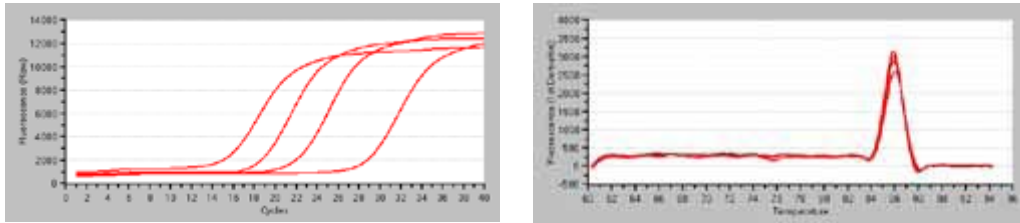


图 2：各 cDNA 10 倍、40 倍稀释后 Human GAPDH 的 Real Time PCR 结果

以上实验结果显示，无论是以 10 倍稀释还是 40 倍稀释的 cDNA 作模板，Human GAPDH 基因都可以得到很好的 Ct 值。

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 (-) 悬液后梯度稀释成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 基因在 10~1000 细胞数范围内、Tfrc 基因在 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。

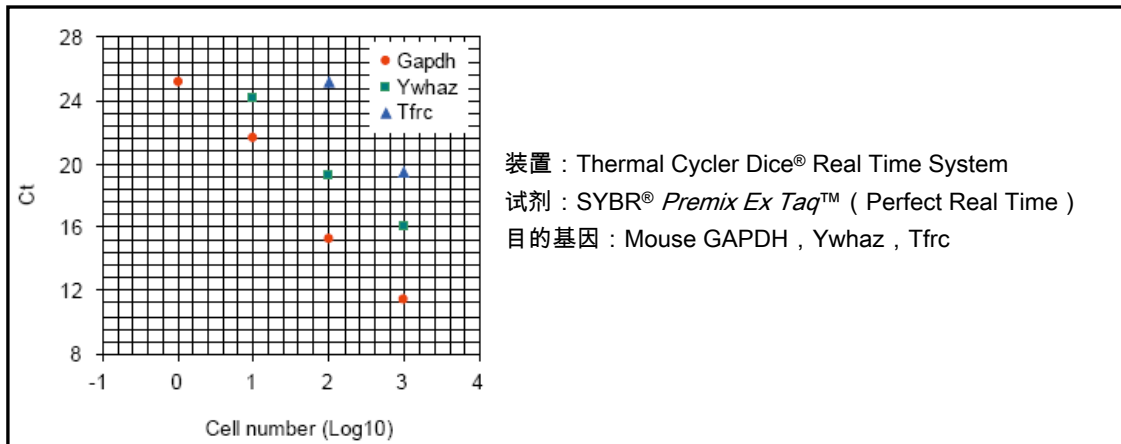


图 3：起始细胞数不同，各基因的 Real Time PCR 解析结果

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，用移液枪分取单离的 8 个 HeLa 单一细胞分别加入到 Lysis buffer 中回收后，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，由单离的 8 个 HeLa 单一细胞分别进行扩增，得到 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。

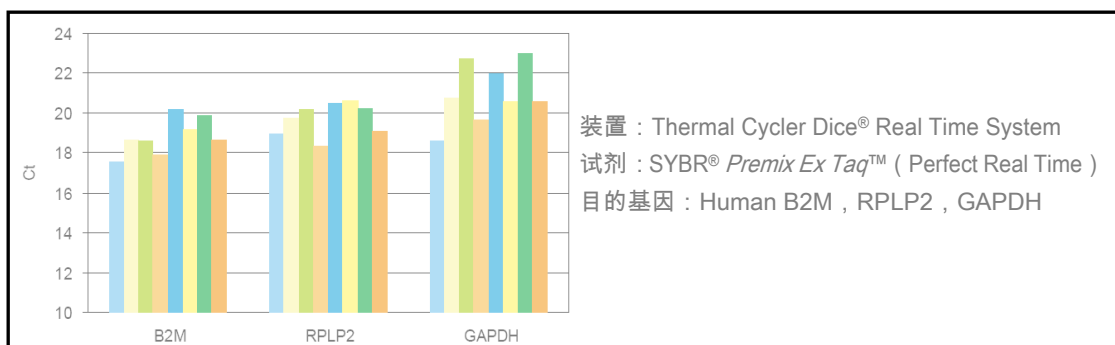


图 4：单一细胞起始的 cDNA 扩增

● 相关产品

SYBR® *Premix Ex Taq*™II (Perfect Real Time) (TaKaRa Code : DRR081A/B)

Premix Ex Taq™ (Perfect Real Time) (TaKaRa Code : DRR039A/B)

Thermal Cycler Dice® Real Time System (TaKaRa Code : TP800/TP860/TP850/TP870)

TaKaRa Ex Taq® Hot Start Version (TaKaRa Code : DRR006A/B)

TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice® (TaKaRa Code : TP600/TP650)

Note

This product is for research use only. It is not intended for use in therapeutic or diagnostic procedures for humans or animals. Also, do not use this product as food, cosmetic, or household item, etc.

TaKaRa products may not be resold or transferred, modified for resale or transfer, or used to manufacture commercial products without written approval from TaKaRa Biotechnology (Dalian) Co.,Ltd..

技术咨询热线：

0411-87641685 , 87641686

8008909508 , 4006518769

宝生物工程（大连）有限公司

TaKaRa Biotechnology (Dalian) Co., Ltd.

辽宁省大连经济技术开发区东北二街 19 号 (116600)

No.19 Dongbei 2nd Street, Development Zone, Dalian, China

电 话：0411-87641681 87641683

传 真：0411-87619946 87621675

E.mail：service@takara.com.cn

网 址：http://www.takara.com.cn