

RT-RamDA™ cDNA Synthesis Kit

(Code No. RMD-201, RMD-201T)

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)	- 5 -
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)	- 6 -
[5] 实验例	- 7 -
1. 与原来的逆转录反应的 cDNA 量的比较	- 7 -
[6] 常见问题	- 8 -
[7] 相关产品	- 8 -
[8] 参考文献	- 9 -

- 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。

※ RT-RamDA™ 是国立研究开发法人理化研究所的商标。

[1] 前言

RT-RamDA™ cDNA Synthesis Kit 可从单细胞或微量 RNA 制备 cDNA。使用本产品制备的 cDNA 可作为 Realtime PCR 实验的模板，用于高灵敏度的基因表达分析。

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。

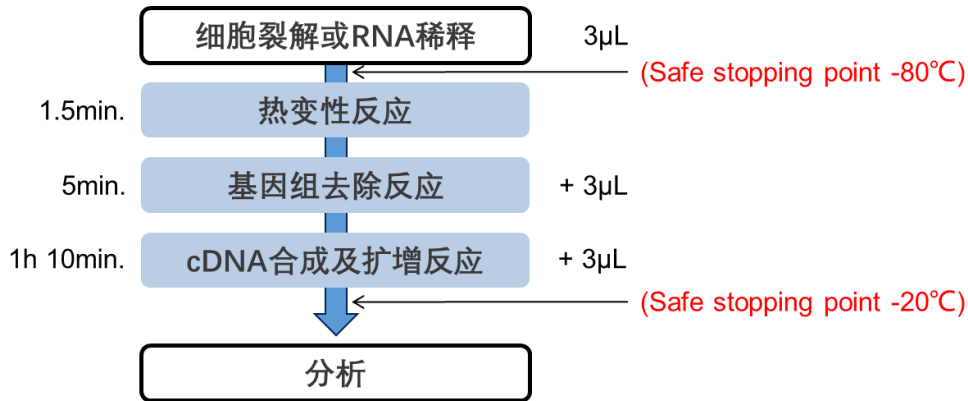


图 1. 本试剂盒的工作流程

◆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. 兼容各种 Realtime PCR 试剂
可与各种 Realtime PCR 试剂组合使用。SYBR® Green I 及 TaqMan® 分析两种方法都可使用。
例如，可使用本公司的 THUNDERBIRD® qPCR Mix (Code: QPS-101, QPS-201)、KOD SYBR® qPCR Mix(Code: QKD-201)等试剂。

[2] 产品组成

本试剂盒中含有以下试剂。各组分请放-20℃保存。

RT-RamDA™ cDNA Synthesis Kit (Code: RMD-201, RMD-201T)

试剂名称	保存	RMD-201	RMD-201T
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

[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。
- Realtime PCR 仪器及 Realtime PCR 试剂
使用时，请根据各仪器、试剂的使用说明书进行操作。

[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	
纯化的 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预混在离心管中。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

※余量设定为 10%

- (2) 向 96 孔板或 8 连管中每孔分装 3μL 细胞裂解液。分装在冰上进行，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：

使用人工挑选等细胞获取方法时，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。

细胞裂解液的制备

	1 个反应(μL)
①Lysis Buffer	2
②Lysis Enhancer	0.45
③RNase Inhibitor	0.05
细胞样品	~0.5
④Nuclease free water	X
Total	3

例) 细胞样品液量为 0.5 μL 时

	20 个反应(μL) [*]	100 个反应(μL) [*]
①Lysis Buffer	44	220
②Lysis Enhancer	9.9	49.5
③RNase Inhibitor	1.1	5.5
Total	55	275

※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 μL 。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 $^{\circ}\text{C}$ 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 $^{\circ}\text{C}$ 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(μL)
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

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

请从稀释的 333pg/ μL total RNA 溶液中取 3 μL 使用。

输入量为 10pg 时

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

请从稀释的 3.3pg/ μL total RNA 溶液中取 3 μL 使用。

- (2) 向 96 孔板或 8 连管中每孔分装稀释后的 RNA 溶液 3 μL 。
- (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 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

2. 热变性反应 (Denature)

- (1) 请将样品板或离心管置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 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 $^{\circ}\text{C}$ 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 $^{\circ}\text{C}$	1.5min.
	4 $^{\circ}\text{C}$	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 TM 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 3 μL 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 $^{\circ}\text{C}$	5min.
	4 $^{\circ}\text{C}$	hold

- (3) 基因组去除反应后，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。

(4) 进行 Realtime PCR 时, 可直接作为模板添加到反应液或稀释后添加。

请按 RT-RamDA™ 反应液(9μL)体积的 1/10~1/25 (0.9~0.36μL) 作为模板添加量。过量添加有时会导致 PCR 反应效率低下, 影响定量准确性。

例) 以 1/25 体积的量添加模板时

	(μL)
RT-RamDA™ 反应液	9
Nuclease free water	41
Total	50

请取稀释过的反应液 2μL 作为 Realtime PCR 的模板使用。

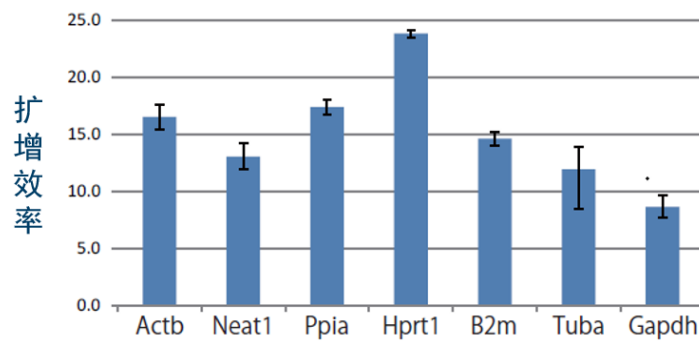
[5] 实验例

1. 与原来的逆转录反应的 cDNA 量的比较

<方法>

使用 NIH3T3 细胞来源的 Total RNA 10pg，分别用 RT-RamDA™ cDNA Synthesis Kit (Code: RMD-201)和原来的逆转录反应试剂 ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix with gDNA Remover(Code: FSQ-301)进行 cDNA 的合成。然后,分别以各自的 cDNA 为模板,使用 THUNDERBIRD® SYBR® qPCR Mix (Code: QPS-201)对 7 种 House Keeping Gene 进行了 Realtime PCR 扩增分析的比较。通过 Ct 值计算出来的 RT-RamDA™ cDNA Synthesis Kit 的 cDNA 量除以原来的逆转录试剂得到的 cDNA 量,最终数值作为扩增效率指标。

<结果>



相比使用原来的逆转录反应试剂时的 cDNA 量,使用 RT-RamDA™ cDNA Synthesis Kit 时可得到大约 10 倍的 cDNA 量。

[6] 常见问题

现象	原因	对策
Realtime PCR 中无信号出现或较迟才能检测到。	RNA 降解了	<ul style="list-style-type: none"> · 请确保 RNA 没有降解。 · 请确保枪头及离心管没有 RNase 的污染。 · 请在冰上进行细胞裂解与 RNA 稀释的操作步骤。
	RNA 的量过少或过多	使用本产品，虽然已确认可以对 10pg 到 1ng 的 RNA 进行逆转录反应，但 RNA 的种类或质量不同，能够反应的 RNA 量也可能有变化。请适当增减模板 RNA 的添加量。
	反应温度不合适	反应条件的改变，会对引物的退火效率、酶活性、逆转录反应后酶的失活等较多方面产生影响。反应温度请务必按照说明书里的条件进行。
	逆转录反应液添加过多	添加量过多时，PCR 反应有可能被抑制。逆转录反应液向 Realtime PCR 反应液中的添加量，请控制在 PCR 反应液量的 10% 以下。

[7] 相关产品

产品名称	容量	Code No.
NGS 测序用 cDNA 制备试剂盒 GenNext® RamDA-seq™ Single Cell Kit	96 次份*	RMD-101
	24 次份*	RMD-101T
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
Illumina 公司 NGS 测序文库定量试剂盒 GenNext® NGS Library Quantification Kit	500 次份/ 20μL 反应	NLQ-101

*96 孔板的 1 个孔的使用次数。

Realtime PCR 试剂

产品名称	容量	Code No.
Probe·SYBR® Green I 检测用 Realtime PCR 试剂 THUNDERBIRD® Probe qPCR Mix	1.67ml×3 支 (500 次份/20μL 反应)	QPS-101
高效率 SYBR® Green I 检测用 Realtime PCR 试剂 KOD SYBR® qPCR Mix	1.67ml×3 支 (500 次份/20μL 反应)	QKD-201
高性能 SYBR® Green I 检测用 Realtime PCR 试剂 THUNDERBIRD® Next SYBR® qPCR Mix	1.67ml×3 支 (500 次份/20μL 反应)	QPS-201

[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