



**QuantAccuracy[®],
RT-RamDA[®] cDNA Synthesis Kit**
([Code No. RMQ-101, RMQ-101T](#))

使用说明书

TOYOBO CO., LTD.
Bioproducts Sales and Marketing Department
OSAKA JAPAN

TOYOBO

—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. 当使用细胞样本时	
	1-1. 细胞裂解·····	3
	1-2. 热变性反应·····	5
	1-3. 基因组去除反应·····	5
	1-4. cDNA 合成和扩增反应 (RT-RamDA®) ·····	6
	2. 当使用纯化的总 RNA 时	
	2-1. RNA 的制备和稀释·····	7
	2-2. 热变性反应·····	8
	2-3. cDNA 合成和扩增反应 (RT-RamDA®) ·····	8
[5]	实验例·····	10
[6]	常见问题·····	13
[7]	相关产品·····	14
[8]	参考文献·····	15

—注意—

本试剂盒中包含的所有试剂均为研究用试剂，切勿将其作为诊断或临床用试剂使用。在使用本试剂盒时，请严格遵守实验室一般注意事项，安全操作。

※QuantAccuracy 是东洋纺（株）的注册商标。

※RT-RamDA 是国立研究开发法人理化研究所的注册商标。

[1] 前言

QuantAccuracy[®], RT-RamDA[®] cDNA 合成试剂盒 (Code No. RMQ-101、RMQ-101T) 是 RT-RamDA cDNA 合成试剂盒 (Code No. RMD-201、RMD-201T) 的二代产品, 可用于从单个细胞或微量 RNA 制备 cDNA。使用本试剂盒制备的 cDNA 可用于 Realtime PCR 的模板, 可进行高灵敏度的基因表达分析。

本试剂盒采用逆转录随机位移扩增 (RT-RamDA[®]) 法^{参考文献 (1)}。RT-RamDA[®] 法是一种利用逆转录酶链置换活性的新型 cDNA 扩增方法, 可高灵敏度地检测来自微量 RNA 的 poly(A) RNA、非 poly(A) 来源的 cDNA。由于 cDNA 在合成的同时扩增, 因此无需像传统方法中添加接头或进行 PCR 反应, 便可抑制因扩增引起的偏差。

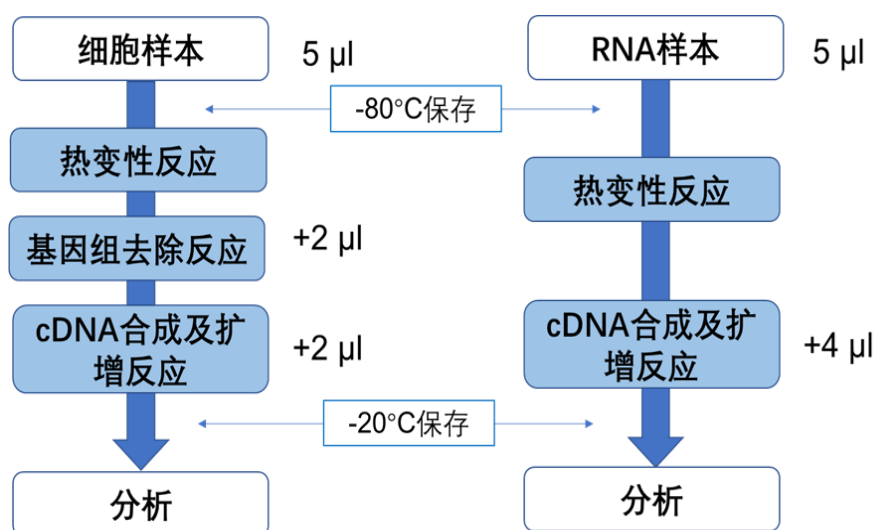


图 1. 本试剂盒使用流程

◆本试剂盒的特点◆

1. 可从单个细胞或微量 RNA 中制备 cDNA

可从 1-500 个细胞或 10 pg-10 ng 总 RNA 中制备 cDNA。

2. 可分析难以检测的基因

通过该试剂盒, RNA 可以被扩增数十倍, 因此即便是通常难以检测的基因, 使用本试剂盒也可以轻松检测到。

3. 扩增偏差小

由于 cDNA 在合成过程中会进行随机扩增反应, 因此可以抑制合成过程中的扩增偏差。

4. 可减少珍贵 RNA 样本的投入量, 节约样本

与传统方法相比, 通过此方法能获得更多的 cDNA 量, 因此可以减少 RNA 样本投入。

5. 可搭配多种 Realtime PCR 试剂

可与我们公司 THUNDERBIRD® qPCR Mix (Code No. QPS-101、QPS-201、QPX-201)、KOD SYBR® qPCR Mix (Code No. QKD-201) 等多种 Realtime PCR 试剂配合使用, 包括 SYBR®Green I 和 TaqMan® assay。

※TaqMan®是 Roche Diagnostic Systems 公司的注册商标。

※SYBR® 是 Molecular Probes, Inc. 公司的注册商标。

※THUNDERBIRD®是东洋纺(株)的注册商标。

[2] 产品组成

本试剂盒包含以下试剂。请在-20℃条件下保存。

QuantAccuracy®, RT-RamDA® cDNA Synthesis Kit 【Code No. RMQ-101, RMQ-101T】

试剂名称	保存	规格 (RMQ-101) 96 次	规格 (RMQ-101T) 24 次
①Lysis Buffer	-20℃	480 µL	120 µL
②Lysis Enhancer	-20℃	108 µL	27 µL
③RNase Inhibitor	-20℃	22 µL	6 µL
④RT-RamDA® Buffer	-20℃	240 µL	60 µL
⑤gDNA Remover	-20℃	54 µL	14 µL
⑥RT-RamDA® Enzyme Mix	-20℃	60 µL	15 µL
⑦RT-RamDA® Primer Mix	-20℃	60 µL	15 µL
⑧Nuclease-free water	-20℃	960 µL	240 µL

[3] 其他必需品

除了本试剂盒外, 还需要准备以下仪器和试剂:

- PCR 仪或恒温仪。

使用时, 请根据各仪器说明书进行操作。

- Realtime 荧光定量 PCR 仪和 Realtime PCR 试剂。

使用时, 请根据各仪器和试剂说明书进行操作。

[4] 使用方法

本试剂盒可以使用细胞或纯化的 Total RNA。

如果使用 FACS 收集细胞，请从【1-1. A】开始；

如果使用除 FACS 之外的方法收集细胞，请从【1-1. B】开始；

如果使用纯化的 RNA，请从【2-1】开始。

之后，请继续进行【1-2】或【2-2】的热变性反应步骤。

样品		细胞裂解 / RNA 稀释	热变性反应
细胞	FACS	【1-1. A】 (P.3)	【1-2】 (P.5)
	FACS 以外	【1-1. B】 (P.4)	
纯化的 RNA		【2-1】 (P.7)	【2-2】 (P.8)

1. 当使用细胞样本时

1-1. 细胞裂解 (Cell lysis)

A. 使用 FACS 收集细胞：

为了有效地进行 RT-RamDA[®] 反应，建议使用 500 个细胞以下的样本。添加过多的细胞可能会降低扩增效率。

(1) 参考下表准备细胞裂解所需的试剂，按照反应量配制并留出余量。

制备细胞裂解液

组分	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
⑧Nuclease free water	2.5	55	275
Total	5	110	550

※增加 10%的余量配制总反应液

(2) 向 96 孔板或 8 联管中每孔分装 5μL 细胞裂解液。注意在冰上操作，分装后请立即封膜或盖上管盖。

(3) 细胞分选前，请将离心管始终置于冰上或 4℃ 保存。请根据您的 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) 迅速进行下一步或将样品置于-80℃保存。

B. 对于 FACS 以外的方法收集细胞：

使用人工挑选等方法收集细胞时，为了保证细胞充分裂解，请控制细胞样品的液量保持在 1.5μL/反应以下。（带入的液体如 1×PBS 超过 1.5μL 可能会抑制反应）

此外，为了有效进行 RT-RamDA®反应，建议使用 500 个或更少的细胞作为样品。添加过多的细胞可能会降低扩增效率。

- (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，然后添加细胞样品。（调整 Nuclease free water 的添加量以使液量达到 5μL。）

制备细胞裂解液

组分	1 个反应 (μL)
①Lysis Buffer	2
②Lysis Enhancer	0.45
③RNase Inhibitor	0.05
细胞样本	~1.5
⑧Nuclease free water	X
Total	5

例如，如果细胞样本的添加量为 1 μL，则按以下组分配制细胞裂解液，每个孔添加 4 μL，并加入 1 μL 细胞样本。（见下表）

例）当细胞样本的添加量为 1μL 时，细胞裂解液的制备

组分	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
⑧Nuclease free water	1.5	33	165
Total	4	88	440

※增加 10%的余量配制总反应液

- (2) 将96孔板或8联管放置在冰上或4℃条件下，并按照细胞收集仪器的说明书，添加细胞样本。添加细胞样品前，请将离心管始终置于冰上或4℃保存，请根据细胞收集仪器的使用说明书，添加细胞样品。
- (3) 添加细胞样品后，请进行密封，离心。
- (4) 迅速进行下一步或将样品置于-80℃保存。

1-2. 热变性反应 (Denature)

- (1) 对已完成细胞裂解的96孔板或8联管离心后，请参照下表温度孵育：
使用冻结样品，热变性反应前，请置于4℃解冻，离心后再进行热变性反应。

热变性反应

Step	Temperature	Time
Denature	75℃	1.5 min.
—	4℃	Hold

1-3. 基因组去除反应 (Digestion of genomic DNA)

- (1) 准备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。

基因组去除反应液的制备

组分	1 个反应 (μL)	20 个反应 (μL) ※	100 个反应 (μL) ※
④RT-RamDA® Buffer	0.2	4.4	22
⑤gDNA Remover	0.45	9.9	49.5
⑧Nuclease free water	1.35	29.7	148.5
Total	2	44	220

※增加 10%的余量配制总反应液

- (2) 向已完成热变性反应的96孔板或8联管中每孔分装2μL基因组去除反应液，离心后，请参考下表温度进行孵育。

基因组去除反应

Step	Temperature	Time
Genomic DNA digestion	30℃	5 min.
—	4℃	Hold

- (3) 在完成基因组去除反应后，请立即进行下一步骤。

1-4. cDNA 合成和扩增反应 (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。

RT-RamDA®反应液

组分	1 个反应 (μL)	20 个反应 (μL) ※	100 个反应 (μL) ※
④RT-RamDA® Buffer	1	22	110
⑥RT-RamDA® Enzyme Mix	0.5	11	55
⑦RT-RamDA® Primer Mix	0.5	11	55
Total	2	44	220

※增加 10%的余量配制总反应液

(3) 向已完成基因组去除反应的 96 孔板或 8 联管中每管添加 2μL RT-RamDA®反应液，离心后，请参照下表反应温度进行孵育。

RT-RamDA®反应

Step	Temperature	Time
Priming 1	25°C	10 min.
Priming 2	30°C	10 min.
Reverse transcription and amplification	37°C	30 min. ※
	50°C	5 min.
Inactivation	98°C	5 min.
—	4°C	Hold

※在 37°C温度下孵育 30min 就能获得足够的 cDNA 产量。如果想进一步提高扩增产量，可以将反应时间延长到 6 小时以内，但可能会产生非特异性扩增。

(4) 完成 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。

(5) 在进行 Realtime PCR 时，将作为模板的反应液直接添加或稀释后添加。在添加 cDNA 溶液时，在 Realtime PCR 中添加的 cDNA 原液量应低于 10%（例如，在将 20μL 用作 qPCR 反应的情况下，cDNA 原液的添加量应低于 2μL）。过多的 cDNA 原液添加会降低 PCR 反应效率，可能导致无法准确定量。

2. 使用纯化后的 Total RNA

如果使用纯化后的 Total RNA 进行 RT-RamDA[®] 反应，建议使用少于 10ng 的 RNA 样本以进行有效的反应。过量添加 RNA 可能会降低扩增效率。

2-1. RNA 的制备与稀释 (RNA dilution)

- (1) 请参考下表制备所需体积的 RNA 稀释液。将 RNA 溶液加入到相应的管中。
(调整 Nuclease free water 的添加量，使总稀释液体积达到 5 μ L。建议添加的 RNA 量在 10pg-10ng 之间。如果使用的 RNA 溶液浓度较高，请先使用 RNase-free 灭菌水或 TE 缓冲液稀释 RNA 溶液。)

如果使用灭菌水或 TE 缓冲液稀释 RNA 溶液，每个反应则可以添加 2.5 μ L RNA 溶液。

RNA 稀释液的制备

组分	1 个反应 (μ L)	10 个反应 (μ L) *
①Lysis Buffer	2	22
②Lysis Enhancer	0.45	4.95
③RNase Inhibitor	0.05	0.55
RNA 溶液	~2.5	~27.5
⑧Nuclease free water	X	X
Total	5	55

※增加 10%的余量配制总反应液

另外，如果添加的 RNA 溶液的体积为 2 μ L，则可以参照下表组分配制 RNA 稀释液，每个孔加入 3 μ L RNA 稀释液，最后加入 2 μ L RNA 溶液。

例) 当 RNA 溶液的体积为 2 μ L 时

组分	1 个反应 (μ L)	20 个反应 (μ L) *	100 个反应 (μ L) *
①Lysis Buffer	2	44	220
②Lysis Enhancer	0.45	9.9	49.5
③RNase Inhibitor	0.05	1.1	5.5
⑧Nuclease free water	0.5	11	55
Total	3	66	330

※增加 10%的余量配制总反应液

- (2) 分装后请立即进行密封（盖盖子）操作并进行离心。

- (3) 请尽快继续下一步操作或将样品储存在-80 $^{\circ}$ C中。

2-2. 热变性反应 (Denature)

- (1) 对于已经进行了 RNA 制备和稀释的 96 孔板或 8 联管，进行离心，并参照下表温度进行孵育。如果使用冷冻样品，请在 4℃ 下解冻后离心，并进行热变性反应。

热变性反应程序

Step	Temperature	Time
Denature	75℃	1.5 min.
–	4℃	hold

2-3. cDNA 合成及扩增反应 (RT-RamDA® 反应)

- (1) 将制备 RT-RamDA® 反应所需的试剂加入到离心管中。请参照下表配制反应液。

RT-RamDA® 反应液

组分	1 个反应 (μL)	20 个反应 (μL) *	100 个反应 (μL) *
④RT-RamDA® Buffer	1.2	26.4	132
⑤gDNA Remover	0.45	9.9	49.5
⑥RT-RamDA® Enzyme Mix	0.5	11	55
⑦RT-RamDA® Primer Mix	0.5	11	55
⑧Nuclease free water	1.35	29.7	148.5
Total	4	88	440

※增加 10% 的余量配制总反应液

- (2) 将上述 RT-RamDA® 反应液添加到经过热变性处理的 96 孔板或 8 联管中，每孔添加 4 μL RT-RamDA® 反应液。离心后，请参照下表温度进行孵育。

RT-RamDA® 反应

Step	Temperature	Time
Priming 1	25℃	10 min.
Priming 2	30℃	10 min.
Reverse transcription and amplification	37℃	30 min. *
	50℃	5 min.
Inactivation	98℃	5 min.
–	4℃	hold

※在 37℃ 反应 30 分钟后，就可以获得足够的扩增产物。如果想进一步提高扩增率，可以将反应时间延长到 6 小时以内但可能会产生非特异性扩增。

- (3) 在 RT-RamDA[®]反应后，尽快进入下一步或在-20℃~-30℃下保存。
- (4) 在进行 Realtime PCR 实验时，将反应液作为模板直接添加或稀释后添加到 Realtime PCR 体系中。Realtime PCR 中添加的 cDNA 原液应小于 10%（例如，在 Realtime PCR 反应中使用 20μL 的反应体系时，cDNA 原液的添加量应小于 2μL）。过量添加会降低 PCR 反应效率，导致无法准确定量。

[5] 实验例

实验例 1 扩增灵敏度和扩增效率确认

<方法>

使用本产品（QuantAccuracy®）和无扩增能力的 A 公司逆转录试剂，以 HeLa S3 细胞中抽提的纯化 RNA（1ng）为模板，制备 cDNA 溶液，并对 2 种核内 RNA 基因（NEAT1、MALAT1）和 8 种 housekeeping 基因（ACTB、GAPDH、ATP5F1A、YWHAZ、PPIA、B2M、RPS18、HPRT1）进行定量分析。

使用本公司的 THUNDERBIRD® SYBR® qPCR Mix（Code No. QPS-201）作为 Realtime PCR 试剂，将 1 μL cDNA 溶液添加到 20 μL Realtime PCR 反应体系中（n = 4）。

<结果>

比较两个试剂盒中各基因的 Ct 值，如图 2 所示，可以确认两个试剂盒之间具有高度相关性。此外，如图 3 所示，两个试剂盒之间各基因的 ΔCt 值均为 5 以上，QuantAccuracy® 的扩增率为 A 公司逆转录试剂的 2⁵=32 倍以上。

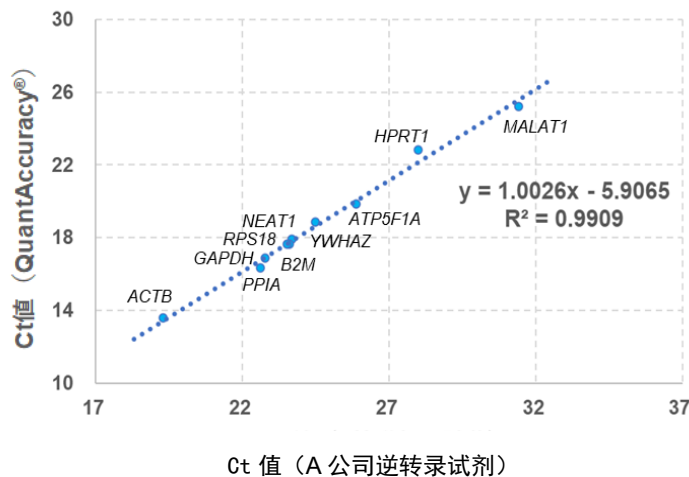


图 2. QuantAccuracy®、A 公司逆转录试剂（无扩增能力）之间的相关性

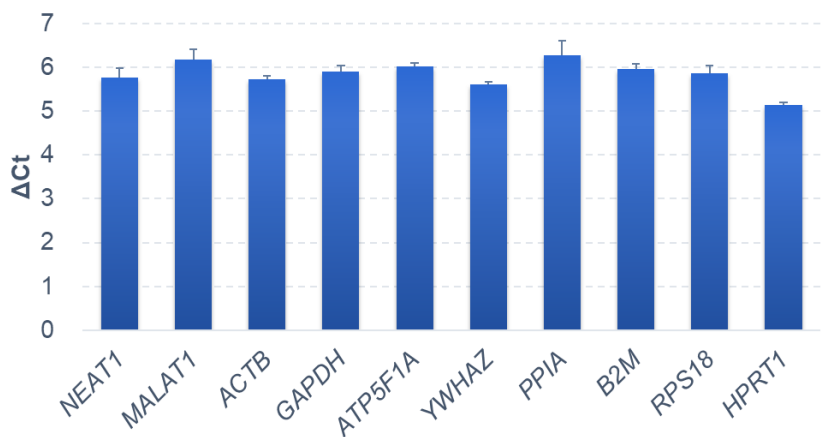


图 3. QuantAccuracy®、A 公司逆转录试剂（无扩增能力）的 ΔCt 值

实验例 2 对 FFPE 样本提取的 RNA 进行检测分析

<方法>

分别使用本产品（QuantAccuracy®）、B 公司、C 公司有扩增能力的逆转录试剂和 D 公司无扩增能力的逆转录试剂，以人类 FFPE 样本提取的 RNA（100pg、1ng）为模板制备 cDNA，并对 2 种核内 RNA 基因（*NEAT1*、*MALAT1*）和 8 种 housekeeping 基因（*ACTB*、*GAPDH*、*ATP5F1A*、*YWHAZ*、*PPIA*、*B2M*、*RPS18*、*HPRT1*）进行定量分析，方法同实验例 1。

Realtime PCR 试剂使用东洋纺 THUNDERBIRD® SYBR® qPCR Mix（Code No. QPS-201），将 1μL cDNA 溶液添加到 20μL Realtime PCR 反应体系中（n = 6）。

<结果>

对 100 pg RNA 中各基因的检测率比较。如表 1 所示，QuantAccuracy®在所有基因中的检测率均表现最优。

对于分析准确性的评估，如图 4 所示，对于每个基因，100pg 和 1ng RNA 的 Ct 值连成直线分析，只有在使用 QuantAccuracy®时，线与线之间是平行的，并且几乎不存在扩增效率的差异。

此外，我们还根据 100pg 和 1ng Ct 平均值计算了两个浓度间的 ΔCt 值约为 3.40。说明使用本产品进行分析时，10 倍的样本量差异约为 $2^{3.40}$ （即 10.6 倍）。因此我们认为即使是 FFPE 样本来源的 RNA，也可以进行高灵敏度的检测。

表 1. 来自 FFPE 样本的纯化 RNA（100 pg）的各基因检测率

	本製品 QuantAccuracy	D公司 cDNA扩增试剂	E公司 cDNA扩增试剂	F公司 逆转录试剂 (无扩增能力)
<i>NEAT1</i>	100%	100%	0%	100%
<i>MALAT1</i>	50%	17%	0%	17%
<i>βACTIN</i>	100%	67%	50%	100%
<i>GAPDH</i>	100%	50%	33%	100%
<i>ATP5F1A</i>	100%	17%	0%	83%
<i>YWHAZ</i>	100%	50%	33%	100%
<i>PPIA</i>	100%	33%	0%	100%
<i>B2M</i>	100%	100%	100%	100%
<i>RPS18</i>	100%	17%	50%	100%
<i>HPRT1</i>	50%	17%	50%	33%

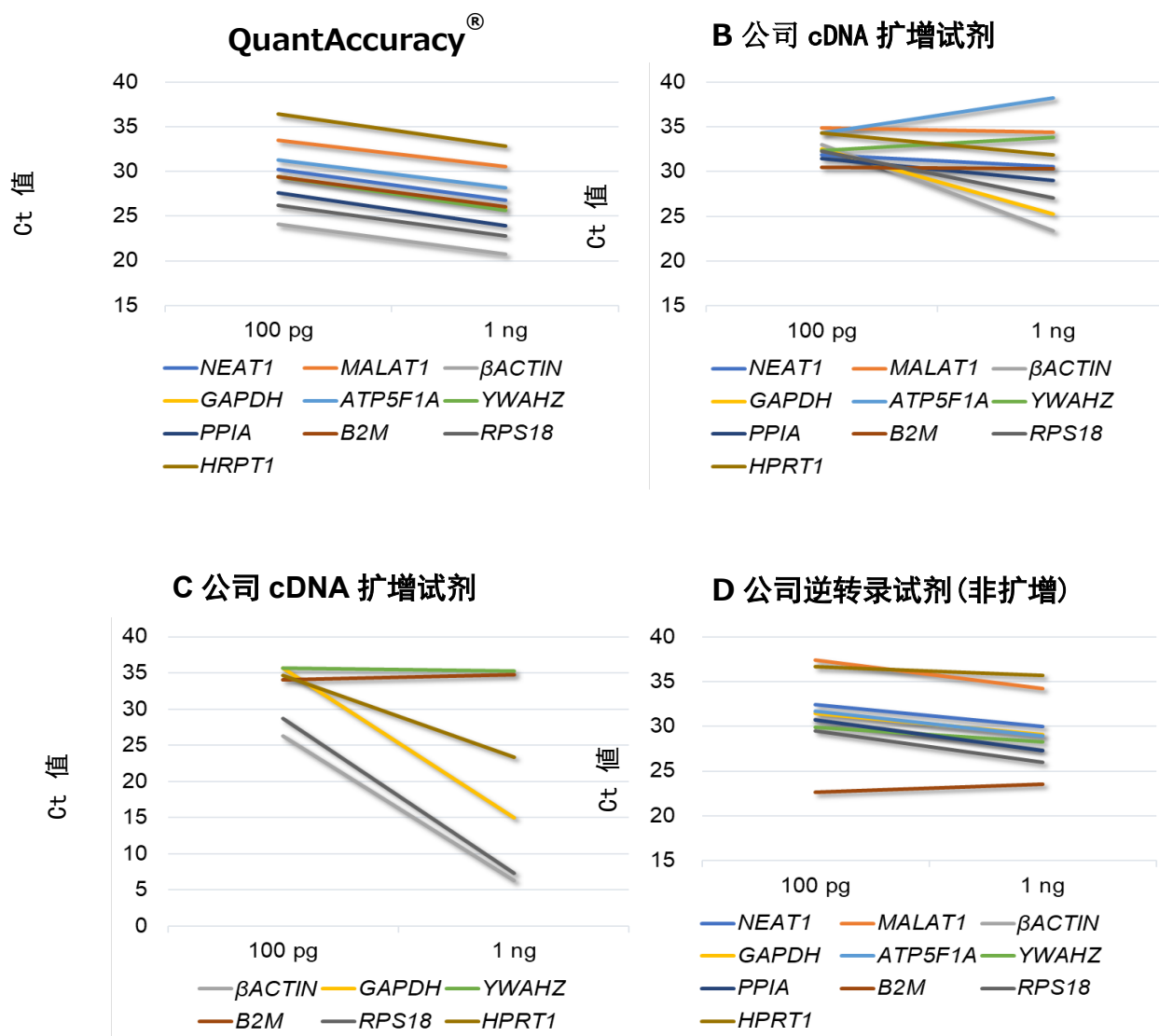


图 4. 每个基因在 100 pg 和 1 ng 时 Ct 值连线图。

[6] 常见问题

现象	原因	对策
Realtime PCR 检测不出信号或者出现延迟。	RNA 降解	· 请确认 RNA 是否已被降解。 · 请确认枪头、离心管等是否受到 RNA 酶的污染。 · 请在冰上进行细胞裂解或 RNA 稀释步骤。
	细胞数或者 RNA 量过多或者过少。	经确认，本产品可用于约 1 个细胞至 500 个细胞或 10 pg 至 10 ng 的 RNA 的 cDNA 制备。但是，由于细胞类型、RNA 类型和质量的不同，反应需要的样品量会有所变化。请增加或减少模板 RNA 的添加量。
	反应温度不合适	反应条件的改变明显影响引物的退火效率、酶活性、逆转录反应后的酶失活等。请务必按照说明书中规定的条件进行反应温度的设置。
	添加了过多的 cDNA	如果添加的 cDNA 原液量过多，可能会抑制 PCR 反应。将制备的 cDNA 溶液添加到 qPCR 反应液时，添加量应不超过总反应体系液量的 10%。

[7] 相关产品

产品名称	内容	Code No.
用于二代测序分析的 cDNA 制备试剂盒 GenNext® RamDA-seq® Single Cell Kit	96 次份*	RMD-101
	24 次份*	RMD-101T
RT-RamDA® cDNA Synthesis Kit	96 次份*	RMD-201
	24 次份*	RMD-201T

*这是该 96 孔板在 1 孔中的使用次数。

Realtime PCR 的试剂

产品名称	内容	Code No.
用于高效 SYBR® Green I 检测系统的 Realtime PCR Master Mix THUNDERBIRD® Next SYBR® qPCR Mix	1. 67ml×3 支 (500 次份/20 µL 反应)	QPX-201
用于长链和富含 GC 的 Realtime PCR Master Mix KOD SYBR® qPCR Mix	1. 67ml×3 支 (500 次份/20 µL 反应)	QKD-201
用于 SYBR® Green I 检测系统的 Realtime PCR Master Mix THUNDERBIRD® SYBR® qPCR Mix	1. 67ml×3 支 (500 次份/20 µL 反应)	QPS-201
荧光探针检测的 Realtime PCR Master Mix THUNDERBIRD® Probe qPCR Mix	1. 67ml×3 支 (500 次份/20 µL 反应)	QPS-101
用于 SYBR® Green I 检测系统的高性能 Realtime PCR Master Mix SYBR® Green Realtime PCR Master Mix	1ml×5 支 (500 次份/20 µL 反应)	QPK-201
荧光探针检测的高性能 realtime PCR Master Mix Realtime PCR Master Mix	1ml×5 支 (500 次份/20 µL 反应)	QPK-101

*GenNext®和 THUNDERBIRD®是东洋纺株式会社的注册商标。

*RamDA-seq®是日本理化研究所的注册商标。

*SYBR®是 Molecular Probes, Inc. 的注册商标。

[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)

更多信息，请访问我们的网站

<http://www.bio-toyobo.cn>

东洋纺生物微信公众号





〈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