

製品コード 3734

研究用

---

# TAKARA

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

---

説明書

v202201Da

---

本製品は、少数の細胞から直接 cDNA の増幅を行うキットです。増幅した cDNA はリアルタイム PCR の鋳型として使用できます。通常、微量な核酸を取り扱う際には精製によるロスが問題となりますが、本製品を用いると RNA や cDNA の精製を行うことなく効率よく cDNA を増幅できます。本製品ではまず細胞溶解を行い、引き続き dT アダプタープライマー (RT dT Primer 2) を用いた逆転写反応により、mRNA から cDNA 合成を行います。次に合成した cDNA に TdT で dA tail を付加し、これを鋳型とした少ないサイクルでの PCR により cDNA を増幅します。

本製品は細胞から直接 cDNA 増幅を行うほか、微量な RNA からの cDNA 増幅にも利用できます。Ver.2 では、Exonuclease I 処理のステップを追加することにより、従来品に比べてプライマー由来の非特異的増幅が抑制され、発現量の少ない遺伝子の増幅効率が向上しています。

## I. 内容 (5 $\mu$ l 反応系、100 回用)

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

\* 1 : PrimeScript™ Reverse Transcriptase、RNase Inhibitor を含む。

\* 2 : Terminal Deoxynucleotidyl Transferase、RNase H を含む。

### キット以外に必要な試薬、機器 (主なもの)

• PCR 試薬

*TaKaRa Ex Taq®* Hot Start Version (製品コード RR006A/B)

• 1.5 ml マイクロチューブ

• 0.2 ml マイクロチューブ

• マイクロピペットおよびチップ

• サーマルサイクラー

*TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice®* Gradient (製品コード TP600)

*TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice Touch* (製品コード TP350) など

## II. 保存

− 20°C

## III. 操作上の注意

1. 反応液を正確に調製するために、反応数プラス  $\alpha$  分の Master mix を調製して各反応チューブに分注してください。反応液量が少ないので、少なくとも 5 反応以上の Master mix をまとめて調製することをお勧めします。
2. 各ステップの反応が終了したら、反応チューブを氷上で冷却し軽くスピンドウンしてから次の操作に進んでください。
3. 反応には 0.2 ml チューブとサーマルサイクラーの使用をお勧めします。

---

## IV. 操作

### <プロトコール A. 細胞から直接 cDNA を増幅する場合>

1. 下記に示す反応液を調製する。  
Cell solution 以外のコンポーネントで必要な本数 +  $\alpha$  分の Master mix を調製し、0.2 ml チューブに分注後、Cell solution を 0.5  $\mu$ l 添加するとよい。

試薬	使用量
Lysis Buffer	1.25 $\mu$ l
Recombinant RNase Inhibitor	0.25 $\mu$ l
RT dT Primer 2	0.1 $\mu$ l
dNTP Mixture	0.1 $\mu$ l
Cell solution *1	0.5 $\mu$ l
RNase Free dH <sub>2</sub> O	2.8 $\mu$ l
Total	5 $\mu$ l

\* 1 : Cell solution の添加量は 0.5  $\mu$ l を上限とし、細胞数の上限は 1,000 個までとする。

Cell solution は、細胞から培地を取り除き、PBS (-) で洗浄した後、PBS (-) などで懸濁した溶液を用いる。

2. 70°C で 1.5 分間インキュベートし、細胞を溶解する。
3. 2. の反応液が入ったチューブに以下の試薬を加えて、全量を 5.6  $\mu$ l とする。  
(2. の反応液以外のコンポーネントで Master mix を調製し、2. の反応液のチューブに 0.6  $\mu$ l ずつ添加すると良い。)

試薬	使用量
2. の反応液	5 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub>	0.3 $\mu$ l
RT Enzyme Mix 2	0.3 $\mu$ l
Total	5.6 $\mu$ l

4. cDNA 合成反応を行う。  
42°C 5分  
85°C 5秒
5. 4. の反応液が入ったチューブに Exonuclease I を 0.6  $\mu$ l 加えて、全量を 6.2  $\mu$ l とする。
6. Exonuclease I 処理を行う。  
37°C 15分  
80°C 15分

7. 6. の反応液が入ったチューブに以下の試薬を加えて、全量を 12.2  $\mu\text{l}$  とする。  
(6. の反応液以外のコンポーネントで Master mix を調製し、6. の反応液のチューブに 6  $\mu\text{l}$  ずつ添加すると良い。)

試薬	使用量
6. の反応液	6.2 $\mu\text{l}$
TdT Buffer	1.2 $\mu\text{l}$
dATP	0.2 $\mu\text{l}$
TdT Enzyme Mix	0.45 $\mu\text{l}$
RNase Free dH <sub>2</sub> O	4.15 $\mu\text{l}$
Total	12.2 $\mu\text{l}$

8. poly dA tail を付加する。

37°C 15 分

70°C 10 分

9. 8. の反応液以外のコンポーネントで Master mix を調製し、新しい 0.2 ml チューブに 22.5  $\mu\text{l}$  ずつ分注する。そこに 8. の反応液を 2.5  $\mu\text{l}$  添加し、下記に示す反応液を調製する。

試薬	使用量
8. の反応液	2.5 $\mu\text{l}$
10 $\times$ Ex Taq Buffer*2	2.5 $\mu\text{l}$
dNTP Mixture (2.5 mM each) *2	2.5 $\mu\text{l}$
PCR Primer Mix 2	0.75 $\mu\text{l}$
TaKaRa Ex Taq HS (5 U/ $\mu\text{l}$ ) *2	0.25 $\mu\text{l}$
RNase Free dH <sub>2</sub> O	16.5 $\mu\text{l}$
Total	25 $\mu\text{l}$

\* 2 : TaKaRa Ex Taq Hot Start Version (製品コード RR006A) を用いる。

10. cDNA 増幅を行う。

95°C	1 分	} 1 cycle
50°C	1 分	
72°C	3 分	
↓		
95°C	30 秒	} 20 cycles
67°C	1 分	
72°C	3 分	
↓		
72°C	10 分	

cDNA 増幅産物は、1/10 から 1/100 程度に希釈してリアルタイム PCR の鋳型として使用する。最適な添加量は検出目的遺伝子の発現量によって異なるので、適宜調整を行う。

cDNA 増幅産物をすぐに使用しない場合には、- 20°C 保存する。

---

【注意】本製品で増幅した cDNA を用いてリアルタイム PCR を行う場合、リアルタイム PCR 用のプライマーは mRNA の 3' 末端から約 1 kb 以内に設計することをお勧めします。

本製品では、cDNA を PCR で均一に増幅するために、1st strand cDNA の合成鎖長が適度な長さになるように調節されています。mRNA の 3' 末端から離れた位置は、効率よく増幅されない可能性がありますので、ご注意ください。

Perfect Real Time サポートシステムのプライマーをご使用の場合は、逆転写反応に Oligo dT Primer を用いる実験に使用できるプライマー（検索結果の position の欄で「dT」のマークがあるプライマー）を選択し、なおかつ増幅位置が、mRNA の 3' 末端から約 1 kb 以内にあるものをご使用ください。

### <プロトコール B. total RNA から cDNA を増幅する場合>

1. 下記に示す反応液を調製する。  
total RNA 以外のコンポーネントで必要な本数 +  $\alpha$  分の Master mix を調製し、0.2 ml チューブに 5.1  $\mu$ l ずつ分注後、total RNA を 0.5  $\mu$ l 添加するとよい。

試薬	使用量
Lysis Buffer	1.25 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub>	0.3 $\mu$ l
RT Enzyme Mix 2	0.3 $\mu$ l
RT dT Primer 2	0.1 $\mu$ l
dNTP Mixture	0.1 $\mu$ l
total RNA *3	0.5 $\mu$ l
RNase Free dH <sub>2</sub> O	3.05 $\mu$ l
Total	5.6 $\mu$ l

\* 3 : total RNA の使用量の上限は 20 ng までとする。

2. cDNA 合成反応を行う。

42°C 5分  
85°C 5秒

この後の操作は、プロトコール A の 5. 以降と同様に行う。

## V. 使用例

### 1. 微量 total RNA からの cDNA 増幅 (従来品との比較)

#### 【方法】

本製品および従来品 (CellAmp Whole Transcriptome Amplification Kit (Real Time) : 終売) を用いて、HeLa 細胞由来の total RNA (20 pg、200 pg、2 ng、20 ng) からそれぞれのプロトコールに従って cDNA を増幅した。得られた cDNA 増幅産物各 5  $\mu$ l を電気泳動に供した (図 1)。

また cDNA 増幅産物を 10 倍希釈 (または 40 倍希釈) し、そのうち 2  $\mu$ l をリアルタイム PCR の鋳型として用いた (図 2)。なお、リアルタイム PCR 実験はすべて TB Green<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup> (Perfect Real Time) を使用し、25  $\mu$ l 反応系で行った。

#### 【結果】

- (1) 図 1 に cDNA 増幅産物を電気泳動した結果を示した。従来品では No template control でもスミアなバンドが認められ、これはプライマーに由来する非特異的増幅物と考えられる。一方、本製品ではバンドの濃さが鋳型量依存的であり、これは目的の cDNA 増幅産物であると思われる。

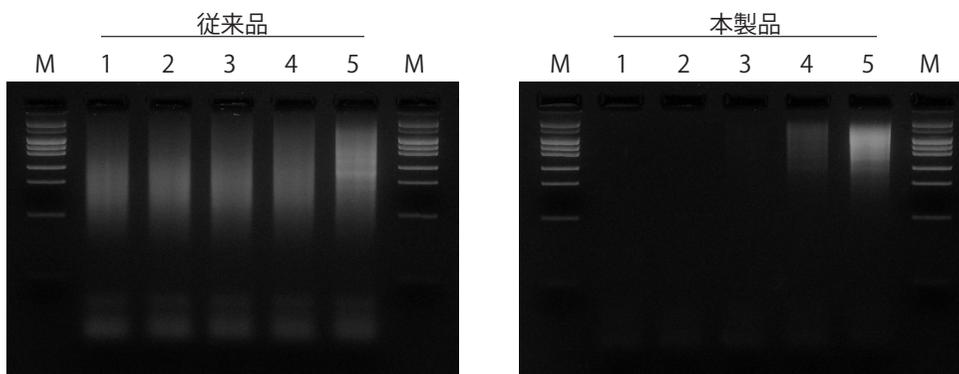


図 1. cDNA 増幅の鋳型量依存性の比較

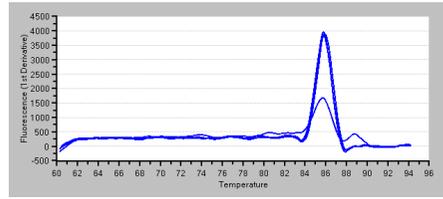
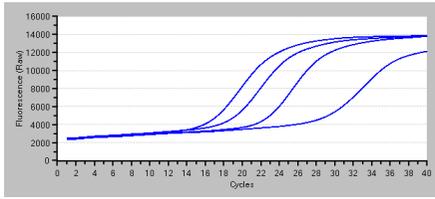
- レーン 1 : No template control  
2 : HeLa total RNA 20 pg  
3 : HeLa total RNA 200 pg  
4 : HeLa total RNA 2 ng  
5 : HeLa total RNA 20 ng  
M : pHY Marker 200 ng

3% Agarose 使用

cDNA 増幅産物 5  $\mu$ l をアプライ

- (2) 図 2-A ~ C にリアルタイム PCR により Human *GAPDH* を検出した結果を示した。10 倍希釈した各 cDNA を鋳型とした場合 (図 2-A)、従来品ではややバックグラウンドの上昇が認められたが、本製品ではバックグラウンドが低く良好な検出が可能であった。なお、cDNA を 40 倍希釈すると、従来品でも良好な検出ができた (図 2-B)。また、Ct 値を比較すると、増幅効率に関しても本製品の方が優れていることが分かった (図 2-C)。

[従来品]



[本製品]

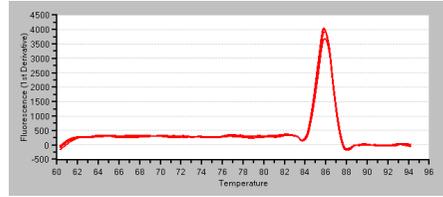
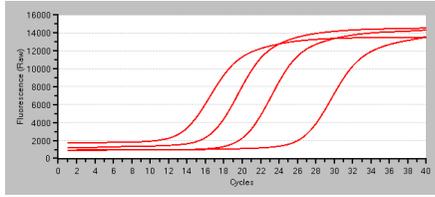
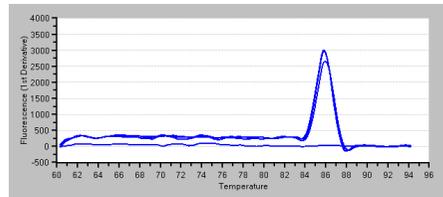
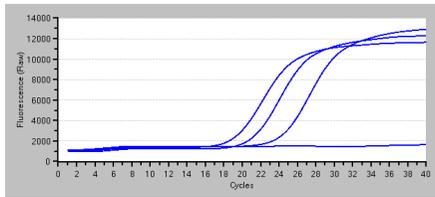


図 2-A. 10 倍希釈した cDNA 増幅産物を鋳型として使用

[従来品]



[本製品]

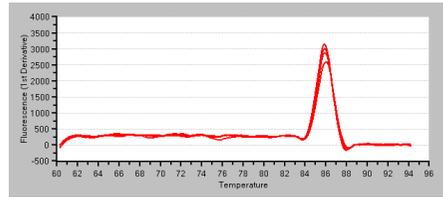
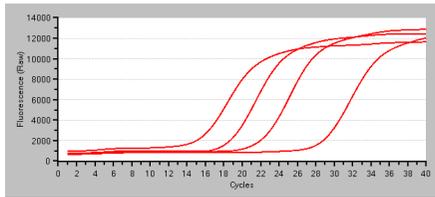
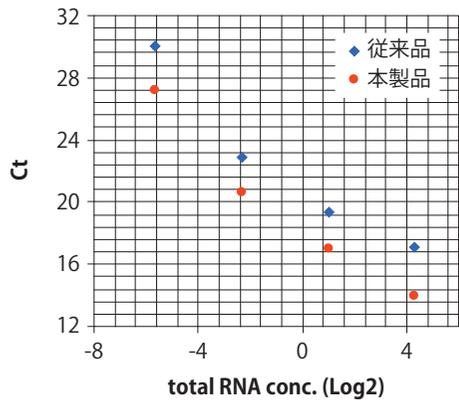


図 2-B. 40 倍希釈した cDNA 増幅産物を鋳型として使用



装置：Thermal Cycler Dice Real Time System  
試薬：TB Green *Premix Ex Taq* (Perfect Real Time)  
ターゲット：Human *GAPDH*  
プライマー：Perfect Real Time サポートシステムのプライマー

図 2-C. Ct 値の比較 (10 倍希釈 cDNA)

## 2. 細胞からの cDNA 増幅

### 【方法】

マウス 3T3 細胞を PBS (-) で  $2 \times 10^6$  cells/ml になるように懸濁し、これを  $2 \times 10^3$  cells/ml まで段階希釈して、各  $0.5 \mu\text{l}$  (1、10、100、1,000 細胞相当量) を cDNA 増幅の鋳型とした。本製品を用いて cDNA 増幅を行い、得られた cDNA 増幅産物を 10 倍希釈し、そのうち  $2 \mu\text{l}$  をリアルタイム PCR の鋳型として用いた。

### 【結果】

図 3 に、リアルタイム PCR により発現量の異なる 3 種類の遺伝子を検出した結果を示した。発現量の多い *Gapdh* では、1 ~ 1,000 細胞の範囲で細胞数依存的な測定結果が得られた。*Gapdh* より発現量が少ない *Ywhaz* は 10 ~ 1,000 細胞、*Tfrc* は 100 ~ 1,000 細胞の範囲で検出されており、検出可能な細胞数の範囲は遺伝子の発現量によって異なることが分かった。また、細胞の種類によって、1 反応に持ち込み可能な細胞数も変わると思われる。

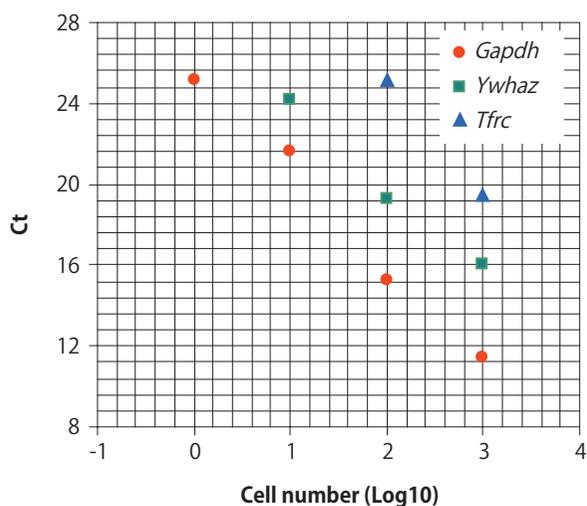


図 3. 初発細胞数が異なる場合のリアルタイム PCR 解析結果

装置：Thermal Cycler Dice Real Time System

試薬：TB Green *Premix Ex Taq* (Perfect Real Time)

ターゲット：Mouse *Gapdh*, *Ywhaz*, *Tfrc*

プライマー：Perfect Real Time サポートシステムのプライマー

### 3. 単一細胞からの cDNA 増幅

#### 【方法】

予め Lysis Buffer を分注した 0.2 ml マイクロチューブを氷上に準備し、マウスピペットで単離した 8 個の HeLa 単一細胞をそれぞれ Lysis Buffer 中に回収した。その後、本製品を用いて cDNA 増幅を行い、得られた cDNA 増幅産物を 10 倍希釈し、そのうち 2  $\mu$ l をリアルタイム PCR の鋳型として用いた。

#### 【結果】

図 4 にリアルタイム PCR により 3 種類の遺伝子を検出した結果を示した。

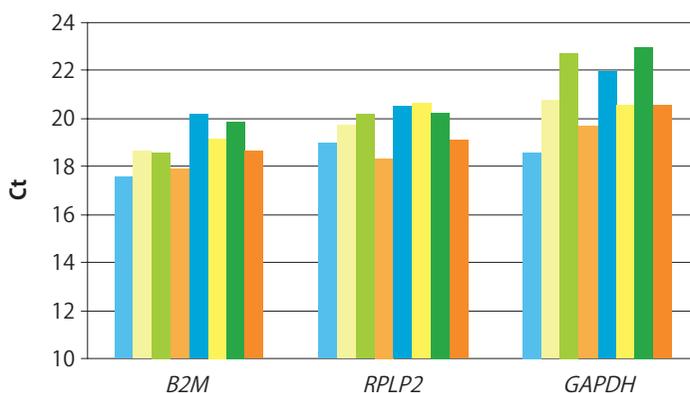


図 4. 単一細胞からの cDNA 増幅 (N = 8)

装置：Thermal Cycler Dice Real Time System

試薬：TB Green *Premix Ex Taq* (Perfect Real Time)

ターゲット：Human *B2M*, *RPLP2*, *GAPDH*

プライマー：Perfect Real Time サポートシステムのプライマー

単離した 8 個の HeLa 単一細胞からそれぞれ cDNA 増幅を行い、リアルタイム PCR を行った結果、すべての反応で目的遺伝子を検出できた。各遺伝子の測定結果にはややバラツキがあるが、その分布には 3 種類の遺伝子間で同様な傾向が認められた。これは、各細胞の mRNA 含量の差を反映しているのではないかと推測される。

## VI. 参考文献

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

## VII. 関連製品

TB Green® *Premix Ex Taq*™ II (Tli RNaseH Plus) (製品コード RR820S/A/B)  
Probe qPCR Mix (製品コード RR391A/B)  
*TaKaRa Ex Taq*® Hot Start Version (製品コード RR006A/B)  
Thermal Cycler Dice® Real Time System III (製品コード TP950/TP970/TP980/TP990)  
CronoSTAR™ 96 Real-Time PCR System (製品コード 640231/640232)  
CronoSTAR™ Portable Real-Time PCR System (製品コード 640245/640247/640249)  
TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice® Gradient (製品コード TP600)  
TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice® *Touch* (製品コード TP350)

Perfect Real Time サポートシステム (<https://www.takara-bio.co.jp/research/prt/>) \*

- \* : ヒト、マウス、ラット、ウシ、イヌ、ニワトリ、イネ、シロイヌナズナの RefSeq 登録遺伝子または Ensembl Plants 登録遺伝子に対してリアルタイム RT-PCR 用プライマーが設計済みです (ご注文によりカスタム合成してお届けします)。本製品と組み合わせて、インターカレーター法 (TB Green 検出) によるリアルタイム RT-PCR を行うことができます。

## VIII. 注意

- ・本製品は研究用試薬です。ヒト、動物への医療、臨床診断には使用しないようご注意ください。また、食品、化粧品、家庭用品等として使用しないでください。
- ・タカラバイオの承認を得ずに製品の再販・譲渡、再販・譲渡のための改変、商用製品の製造に使用することは禁止されています。
- ・ライセンスに関する情報は弊社ウェブカタログをご覧ください。
- ・*TaKaRa Ex Taq*、Thermal Cycler Dice、TB Green はタカラバイオ株式会社の登録商標です。CellAmp、PrimeScript、*Premix Ex Taq*、CronoSTAR はタカラバイオ株式会社の商標です。その他、本説明書に記載されている会社名および商品名などは、各社の商号、または登録済みもしくは未登録の商標であり、これらは各所有者に帰属します。

製品についての技術的なお問い合わせ先

**テクニカルサポートライン**

Tel 077-565-6999 Fax 077-565-6995

ウェブサイト <https://www.takara-bio.co.jp>

**タカラバイオ株式会社**