

兔单 B 细胞表达框扩增试剂盒

Cat: DTT09

1. 产品简介

本产品可以兔 1-500 个 B 细胞或对应细胞来源的 10pg-5ng 总 RNA 为模板，在同一管内实现从细胞到全长 cDNA 的获得，分别特异性扩增 B 细胞受体 IgG 重链可变区、轻链 Kappa 可变区，无需纯化，进而利用 PCR 方法获得瞬时转染活性 DNA 片段，其可直接用于哺乳动物细胞的瞬时转染。

2. 产品组分

试剂名称	96 rxns	储存条件
dNTP Mix	192μl	-20°C
Cell Lysis Buffer	96μl	-20°C
RT Primer	38.4μl	-20°C
DTT	96μl	-20°C
Murine RNase Inhibitor	38.4μl	-20°C
Reverse Transcriptase	38.4μl	-20°C
2 × PCR Mix	10ml	-20°C
PCR1 Primer Mix	480μl	-20°C
PCR2 rHeavy Primer Mix	96μl	-20°C
PCR2 rLight Primer Mix	96μl	-20°C
PCR3 rHeavy TAD Mix	192μl	-20°C
PCR3 rLight TAD Mix	192μl	-20°C
PCR3 TAD Primer Mix	192μl	-20°C
RNase- Free water	6ml	-20°C
TS Primer	96μl	-80°C
5 × RT Buffer	384μl	-80°C

3. 自备材料

1) 单 B 细胞样本或对应微量 RNA;

2) 振荡器、瞬时离心机, PCR 仪等。

4. 试验步骤

4.1 RT-A

1 将 dNTP Mix、RT Primer 以及 Cell Lysis Buffer 从-20℃冰箱中取出, 在冰上进行融化, 待完全融化后涡旋混匀, 瞬时离心。

按照下表配制 RT-A 反应液

序号	组分名称	体积 (μl)
1	Single B Cell ^a	X
2	RNA	10pg-5ng 带 polyA 的总 RNA
3	dNTP Mix	2.0
4	Cell Lysis Buffer ^b	1.0
5	RT Primer	0.4
6	RNase- Free water	补至 10μl

注: a: 单 B 细胞体积不要超过 6.6μl, 不足之时用水补上至总体积为 10μl。

b: 模板为 RNA 时不添加此试剂。

轻轻涡旋混匀, 瞬时离心。72℃反应 3min, 结束后立即放于冰上不少于 3min, 进行后续反应。

4.2 RT-B

将 RT-B 各试剂从各冰箱中取出。震荡混匀, 瞬时离心, 按照下表配制 cDNA 第一链合成反应体系:

序号	组分名称	体积 (μl)
1	DTT	1.0
2	Murine RNase Inhibitor	0.4
3	TS Primer	1.0
4	5 × RT Buffer	4.0
5	Reverse Transcriptase	0.4
6	RNase- Free water	3.2
7	RT-A 产物	10.0
	总体积	20.0

注: 1、TS Primer、Reverse Transcriptase 轻弹混匀, 瞬时离心, 勿涡旋;

2、5 × RT Buffer、TS-Primer 于-80℃保存, 如多次使用请分装, 尽量避免反复冻融。

轻轻涡旋混匀, 瞬时离心后置于冰上。待 PCR 仪温度升至 42℃, 放入样本板, 程序如下所示:

序号	温度 (°C)	时间
1	42℃	90 min
2	70 °C	15 min
3	4 °C	Hold

反应结束后可将产物置于冰上或于 4℃ 短期保存，以进行后续扩增，

注：此步骤建议不暂停。

4.3 PCR1 cDNA 全长扩增

将 PCR1 试剂从 -20℃ 冰箱中取出，冰上融化，待完全融化后，涡旋混匀，瞬时离心后按照下表配制 PCR 反应体系（所有步骤均在冰上操作）。

序号	组分名称	体积 (μl)
1	2 × PCR Mix	25.0
2	PCR1 Primer Mix	5.0
3	RT-B 产物	20.0
	总体积	50.0

将上表混合液轻轻涡旋混匀，瞬时离心。在 PCR 仪上反应，具体反应程序如下：

序号	程序	温度 (°C)	时间	循环数
1	预变性	98	1min	1
2	变性	98	10s	22
3	退火	62	15s	
4	延伸	72	3min	
5	延伸	72	5min	1
6	保存	4	hold	1

待反应结束后，瞬时离心，然后将 PCR 产物放置于冰上备用或于 -20℃ 保存。

4.4 PCR2 基因片段扩增（重链和轻链可变区扩增）

将 PCR2 试剂从冰箱中取出，待冰上完全融化后，涡旋混匀，瞬时离心。

按照下表分别配制重链和轻链 PCR2 反应液（所有步骤均在冰上操作）

序号	组分名称	体积 (μl)
1	2 × PCR Mix	10.0
2	PCR2 rHeavy Primer Mix 或 PCR2 rLight Primer Mix	1.0
3	RNase- Free water	7.0
4	PCR1 产物	2.0
	总体积	20.0

振荡器轻轻涡旋混匀，瞬时离心。在 PCR 仪上反应，具体反应程序如下：

序号	程序	温度 (°C)	时间	循环数
1	预变性	95	3min	1
2	变性	95	15s	35
3	退火	58	15s	
4	延伸	72	45s	
5	延伸	72	5min	1
6	保存	4	hold	1

待反应结束后，瞬时离心，然后将 PCR 产物放置于冰上备用或于-20℃保存。

4.5 PCR3 扩增（重、轻链表达框产物构建）

将 PCR3 试剂从冰箱中取出，待冰上完全融化后，涡旋混匀，瞬时离心。

按照下表分别配制重链和轻链 PCR3 反应液（所有步骤均在冰上操作）

序号	组分名称	体积 (μl)
1	2 × PCR Mix	25.0
2	PCR3 rHeavy TAD Mix 或 PCR3 rLight TAD Mix	2.0
3	PCR3 TAD Primer Mix	1.0
4	PCR2 产物	1.5
5	RNase- Free water	20.5
	总体积	50.0

振荡器轻轻涡旋混匀，瞬时离心。在 PCR 仪上反应，具体反应程序如下：

序号	程序	温度 (°C)	时间	循环数
1	预变性	95	3min	1
2	变性	95	15s	30
3	退火	59	15s	
4	延伸	72	2min	
5	延伸	72	5min	1
6	保存	4	hold	1

待反应结束后，瞬时离心，然后取部分产物进行琼脂糖凝胶电泳检测预估片段大小，剩余产物于-20℃保存备用。

5. 注意事项

1) PCR 操作均在冰上进行；

2) 所有 PCR 试剂及耗材需无酶无菌;

感谢您选择德泰生物，我们竭诚为您服务！

For Research Use Only!