

EZ-press Cell to cDNA Kit for microRNA 说明书

Cat.No.:EZB-miRT1 (本试剂盒专为qPCR设计, 不建议用于基因克隆)

使用本产品前, 请务必仔细阅读本说明书, 以保证操作正确

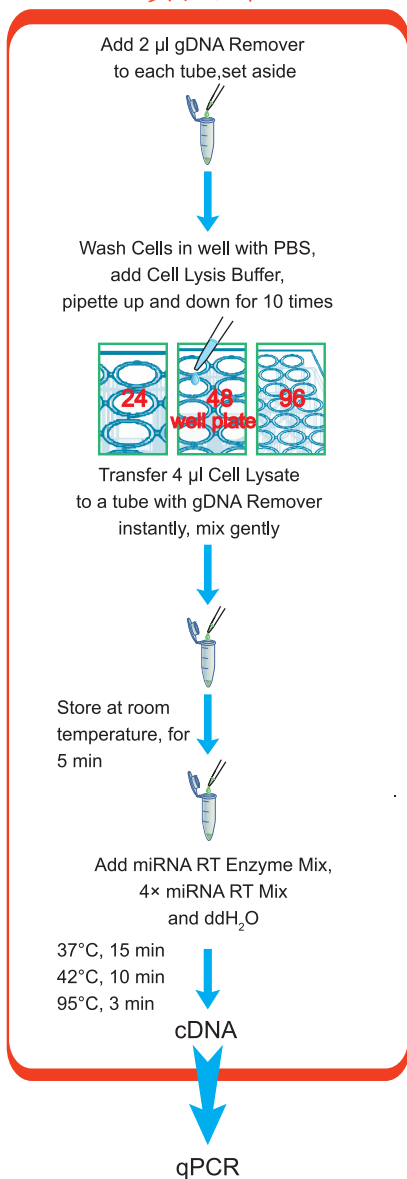
产品组分

组分	EZB-miRT1 (50 Rxns)
Cell Lysis Buffer	11 ml
gDNA Remover	110 μ l
miRNA RT Enzyme Mix	110 μ l
4x miRNA RT Buffer	275 μ l
Universal 3' qPCR Primer (10 μ M)	750 μ l
U6 Primer (10 μ M)	150 μ l
Nuclease free ddH ₂ O	1 ml

保存条件

所有组分建议储存在-20°C。

实验流程



注意

- 建议实验开始前, 先解冻Cell Lysis Buffer, 解冻后需颠倒几次使之充分混匀, 然后放在室温备用, 请勿涡旋振荡。
- 建议优先使用24孔板培养细胞, 48或96孔板亦可, 否则需要用胰酶消化后收集到EP管中进行裂解; 对于悬浮细胞, 需要离心去除培养基, 用PBS重悬后取一定数量的细胞转移到EP管中, 离心去除PBS后再加入裂解液裂解。
- 细胞密度: 对于24孔板培养的细胞, 建议收细胞时细胞密度达到50%~100%为佳(约20万~40万), 30万~40万左右最好, 以使所加裂解液能完全覆盖孔底。
- 细胞从培养箱中取出后建议放在室温, 切勿放在冰上, 以免影响细胞状态。
- 初次使用时建议至少多养一个孔, 以便在使用本试剂盒做实验时对细胞进行计数, 之后可参考估数图进行估数。
- 所有试剂使用前须混匀。本试剂安全无毒, 建议在开放环境进行实验即可; 如果在通风橱内操作, 建议不要开风机, 以免吹干细胞导致RNA严重降解。

细胞裂解

1. 准备好与样品数量相同的无酶的PCR管, 向每个离心管中加入2 μ l gDNA Remover, 置于冰上待用。

2A. 对于贴壁细胞:

- 吸去培养基, 加入PBS(沿侧壁小心加入约200 μ l PBS, 轻轻晃动几下)。
- 依次裂解细胞:
小心吸净第一个样品中的PBS, 按照50 μ l/10万细胞的量加入Cell Lysis Buffer, 吹吸3~4次(尽量把有细胞区域全部吹到, 以便完全裂解细胞; 吹时, 液体不要完全吹出, 枪头内可以留一点; 吸时, 液体也不要完全吸完, 防止吸入气泡), 然后用移液器枪尖在孔底刮几圈以便充分裂解, 接着再次在孔底各处吹吸并刮擦, 如此循环重复至少5次以上; 对于比较结实的细胞, 需要循环重复10次以上, 以便充分裂解细胞。
【注意: 需要吹打至孔底看不见明显的细胞残留为止】。立即吸取4 μ l裂解产物至提前加好2 μ l gDNA Remover的PCR管中, 轻柔吹吸5~6次混匀, 置于冰上。

c) 其余样品依次按照上述步骤分别处理, 每次处理一个样品。

对于一些细胞体积与常见细胞(比如293T细胞)的体积差异极大的细胞种类, 建议进行预实验, 确定一个合适的裂解液比例后再进行正式实验。

2B. 对于悬浮细胞:

- 把细胞悬浮液吸到离心管中, 500 g离心3 min后, 去除培养基, 用PBS悬浮细胞, 然后进行细胞计数。
- 对于与B、T细胞体积大小类似的细胞, 取含有10万~30万细胞的PBS悬液, 500 g离心3 min后, 吸净上清, 加入10~30 μ l的Cell Lysis Buffer, 吹打10次左右使其充分裂解;
- 对于与常规细胞体积大小类似的细胞如巨噬细胞、CHO等细胞, 取含有10万~30万细胞的PBS悬液, 500 g离心3 min后, 吸净上清, 加入50~150 μ l的Cell Lysis Buffer, 吹打10次左右使其充分裂解;
- 细胞裂解后, 立即吸取4 μ l裂解产物至提前加好2 μ l gDNA Remover的PCR管中, 轻柔吹吸5~6次混匀, 置于冰上。

3. 所有样品处理完成后, 室温(15~25°C)放置5 min, 以充分去除基因组DNA。

4. 裂解、去gDNA完成后, 转移至冰上。

细胞裂解、去gDNA完成后, 放置在冰上, 并立即进行逆转录(建议尽快进行逆转录, 以获得最佳的实验结果。裂解产物冰上放置不应超过30 min)。

逆转录

5. 在上述细胞裂解产物中直接加入miRNA RT Enzyme Mix、4x miRNA RT Mix和ddH₂O, 配制逆转录反应体系(20 μ l体系)。

Components	Volume (20 μ l)
Cell lysates	6 μ l
miRNA RT Enzyme Mix	2 μ l
4x miRNA RT Buffer	5 μ l
Nuclease free ddH ₂ O	7 μ l

6. 将上述逆转录体系混匀后进行逆转录反应(37°C, 15 min; 42°C, 10 min; 95°C, 3 min)完成后, 转移至冰上。

逆转录体系须吹吸10次或充分颠倒混匀(很重要), 然后短时离心, 再开始反应, 逆转录完成后置于冰上。

7. 逆转录产物作为模板进行qPCR反应。

逆转录产物可直接作为qPCR模板使用, 也可根据基因表达的丰度进行稀释, 一般建议稀释5~10倍; 如不能立即进行qPCR, 建议放-80°C保存以备下次使用, 在下次解冻使用时应完全解冻充分混匀后再用。在20 μ l qPCR反应体系中, 模板cDNA如果不稀释建议用0.4 μ l(最多不超过0.8 μ l); 如果稀释5倍建议用2 μ l; 建议用10 μ M的正反向引物各0.4 μ l。

EZ-press Cell to cDNA Kit for microRNA Trouble Shooting

1. 用已经验证过的引物检测基因表达，检测到的内参基因Ct值偏大，或无法做出正常的扩增结果。

解决办法：

a. 检查所使用的试剂和引物是否可靠，最好使用新鲜的试剂。溶解好的引物应该分装为小份冻存，以减少引物降解及降低污染的可能性。

b. 检查操作流程是否正确。例如：

1. Cell Lysis Buffer用前须混匀。

2. 裂解细胞前，须先用PBS洗一次并将PBS彻底吸干净。

3. 加入裂解液后须吹打10次以上，将细胞充分裂解至孔底看不见残留的细胞为止。

4. 加入细胞裂解产物和gDNA Remover后混匀，室温裂解5 min，温度和时间不可随意更改。

5. 所有反应体系反应前必须充分混匀。

6. 须使用本试剂盒提供的逆转录试剂进行逆转录。

c. 对于扩增结果异常的情况，需确保每50 μl Cell Lysis Buffer裂解的细胞数一般不超过 1×10^5 细胞。如果结果仍然未改善，尝试减少细胞数到 5×10^4 ，或裂解液用量加倍，或增加吹打次数到20次以上，直至结果改善【建议实验前先进行预实验，以确定最佳细胞数量】。

d. 对于细胞数较少 (< 10000) 的实验，建议把细胞收集至EP管中操作，确保PBS洗涤细胞后，弃去上清时未导致细胞丢失，裂解液中存在足量的细胞，Cell Lysis Buffer用量最少可为5 μl 。如果细胞数更少 (1 ~ 1000个)，则建议使用EZBioscience品牌的单细胞到cDNA试剂盒 (货号为B0011) 进行实验。

e. 建议后续实验使用高品质的qPCR Mix, 比如选用兼容性最好的EZBioscience品牌的2 \times SYBR Green qPCR Master Mix (货号为A0001/A0012)，以便获得最佳结果。

f. 对于与常规细胞体积差异较大的细胞种类，建议先做预实验简单摸索一下实验条件，即找到裂解液对应细胞数的最佳比例，以便获得最佳结果。

2. 内参基因扩增正常，但某些丰度很低的基因，扩增后Ct值过大或无法被检测，或扩增曲线、熔解曲线不够理想。

解决办法：

a. 可尝试适当增加细胞用量或减少裂解液用量，比如按照每 1×10^5 细胞用40 μl Cell Lysis Buffer来裂解；

b. 确保该引物能很好地适用于qPCR，引物没有被污染或降解，可适当提高低丰度基因引物的用量；

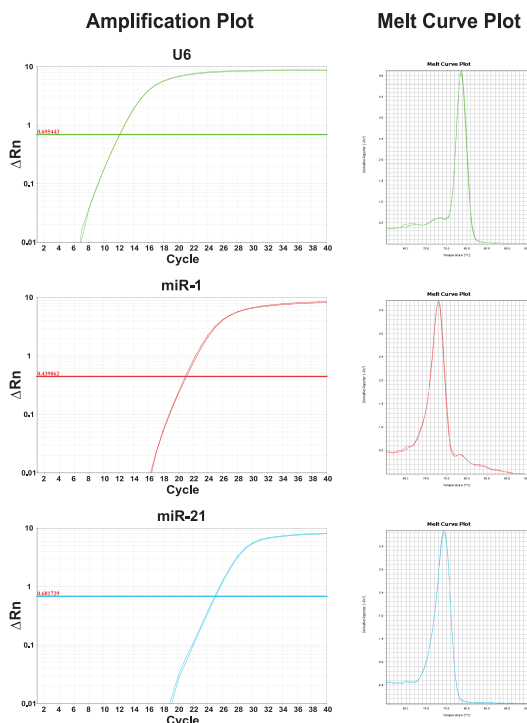
c. 裂解后可以增加裂解产物的量到最大8 μl ，加入2 μl gDNA Remover，吹打混匀，室温放置5 min，然后用于逆转录。

培养板	24孔板					96孔板			
细胞密度(%)	20~30	35~45	55~65	80~100		10~15	30~45	60~80	90~100
细胞数(万)	~10	~20	~30	~40	~50	~2	~5	~10	~15
裂解液(μl)	80	100	150	200	200	16	40	50	75
裂解液用量比例	80 $\mu\text{l}/10$ 万细胞	40~50 $\mu\text{l}/10$ 万细胞				80 $\mu\text{l}/10$ 万细胞	50 $\mu\text{l}/10$ 万细胞		

注意：建议培养至细胞数达到左表中黄色区域对应的细胞数时进行实验。

代表性实验结果

使用EZ-press Cell to cDNA Kit for microRNA试剂盒检测A549细胞中microRNA表达的结果：



左图：使用EZ-press Cell to cDNA Kit for microRNA试剂盒处理A549细胞，得到的cDNA用针对U6、miR-1以及miR-21的qPCR引物检测这几个microRNA表达的结果。如图所示，miRNA的扩增曲线和熔解曲线及Ct值均非常好，显示使用此试剂盒能够很好地检测microRNA的表达。