EZ-press Cell to cDNA Kit PLUS II 说明书

Cat.No.:B0003C（本试剂盒专为qPCR设计，不建议用于基因克隆）

使用本试剂盒前，请务必仔细阅读本说明书，以保证操作正确

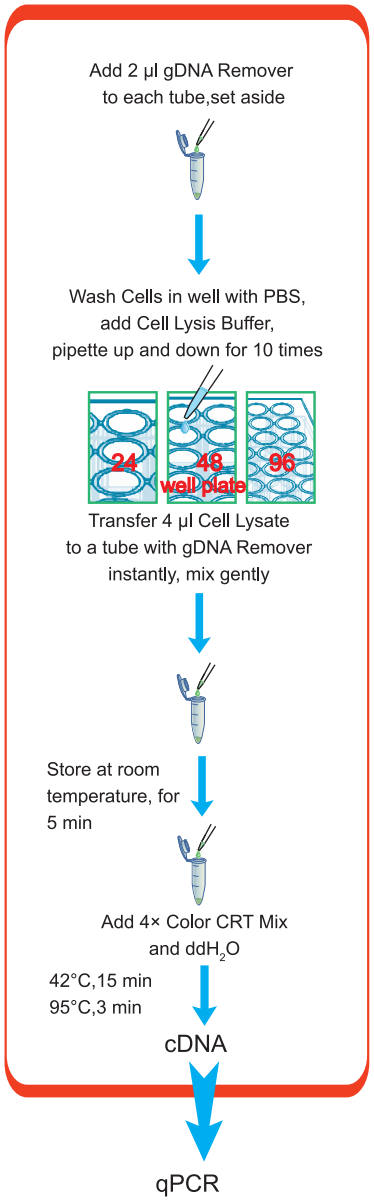
产品组分

组 分	B0003C-S (10 Rxns)	B0003C (100 Rxns)
Cell Lysis Buffer	2.2 ml	22 ml
gDNA Remover	22 μl	220 μl
4× Color CRT Mix	55 μl	550 μl
RNase free ddH_2O	1 ml	2 ml

保存条件

所有组分建议储存在-20°C。

实验流程



注意

a. 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。

b. 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 ~ 40万），30万~ 40万左右最好，以使所加裂解液能完全覆盖孔底。

c. 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。

d. 初次使用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。

e. 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。

f. 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。

g. 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。

细胞裂解

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

2A. 对于贴壁细胞（可选择水平摇床裂解和吹打裂解）：

a) 吸去培养基，加入PBS（沿侧壁小心加入约200 μl PBS，轻轻晃动几下）。

水平摇床裂解：吸净PBS，若样品数较多，应分批操作，按照50 μl/10万细胞的量加入Cell Lysis Buffer，置于摇床上室温摇5 min（转速150 rpm），立即吸取4 μl裂解产物至提前加好2 μl gDNA Remover的PCR管中，轻柔吹吸5 ~ 6次混匀，置于冰上。

吹打裂解：小心吸净第一个样品中的PBS，按照50 μl/10万细胞的量加入Cell Lysis Buffer，吹吸3 ~ 4次（尽量把有细胞的区域全部吹到，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，以使细胞充分裂解【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 μl裂解产物至提前加好2 μl gDNA Remover的PCR管中，轻柔吹吸5 ~ 6次混匀，置于冰上。其余样品依次按照上述步骤分别处理，每次处理一个样品。

2B. 对于悬浮细胞：

a) 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。

b) 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 μl 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 μl 的Cell Lysis Buffer，吹打10次左右使其充分裂解；

c) 细胞裂解后，立即吸取4 μl裂解产物至提前加好2 μl 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（19 ~ 27°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**4× Color CRT Mix**和ddH_2O，配制逆转录反应体系（20 μl体系）。

组分	体积 (20 μl)
Cell lysate	6 μl
4× Color CRT Mix	5 μl
RNase free ddH_2O	9 μl

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

逆转录体系配制好需使用移液器吹吸10 ~ 15次使之充分混匀（很重要，建议混匀时将移液器量程调到18 μl），然后再进行逆转录反应，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反应，建议放在-80°C冰箱中保存。在下次使用时应完全解冻且充分混匀。在20 μl qPCR反应体系中：模板cDNA如果不稀释建议用0.4 μl（最多不超过0.8 μl）；如果稀释5倍建议用2 μl；建议用10 μM的正反向引物各0.4 μl。

EZ-press Cell to cDNA Kit PLUS II 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× 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。

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。

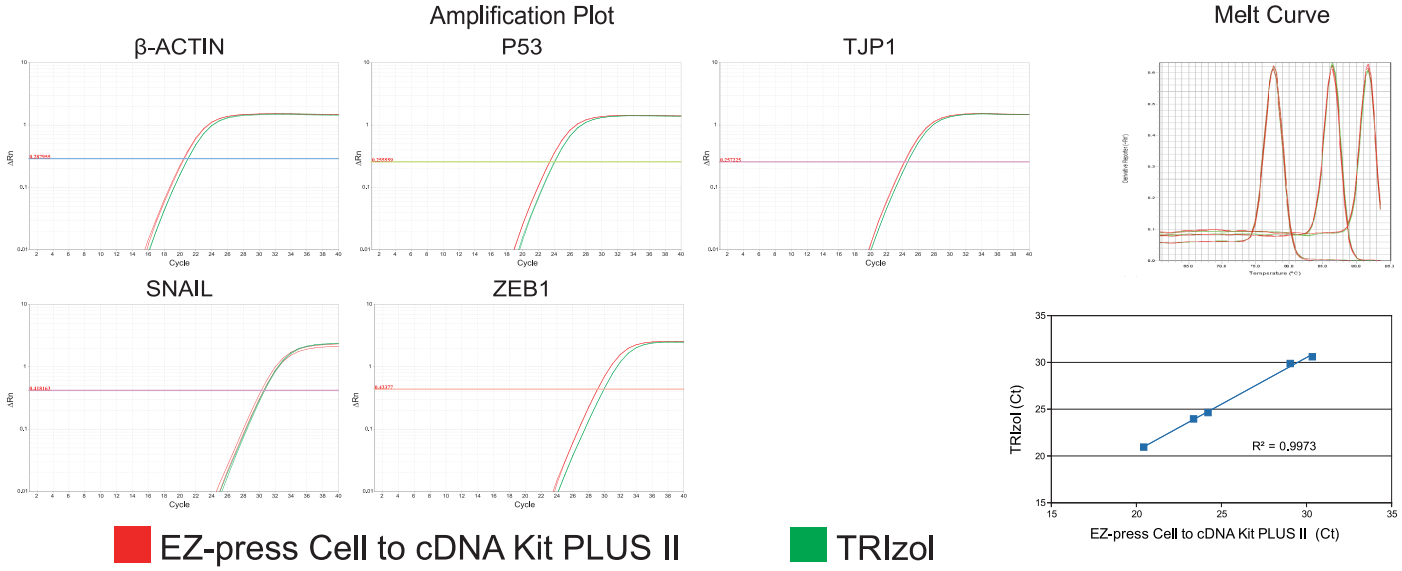
b.确保该引物能很好地适用于qPCR，引物没有被污染或降解，可适当提高低丰度基因引物的用量。

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	~10万	~20万	~30万	~40万	~50万	~2万	~5万	~10万	~15万
裂解液**(μl)**	80	100	150	200	200	16	40	50	75
裂解液用量比例	80 μl/10万细胞	40-50 μl/10万细胞				80 μl/10万细胞		50 μl/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



由上图可见，EZ-press Cell to cDNA Kit PLUS II 做出的结果与Trizol方法高度一致（线性相关系数R^2=0.9973）。