

EZ-press SINGLE Cell to cDNA Kit

说明书

Cat. No.: B0011

一、产品简介

本试剂盒适用于 1~1000 个细胞样品中的基因表达分析。具体原理是：1~1000 个细胞样品通过裂解释放出 RNA，然后再进行逆转录和预扩增反应，得到的 cDNA 的量即可满足后续 qPCR 检测的要求。

二、产品组分

组分	B0011 (100 Rxns, 20 µl/Rxn)
Cell Lysis Buffer	5.5 ml
2× Pre-Amp Mix	1.1 ml
Nuclease free ddH ₂ O	1 ml

三、保存条件

本试剂盒所有组分建议置于-20°C 保存。过期日期详见产品标签中有效期信息。

四、操作步骤

注意：使用前，请先将 Cell Lysis Buffer 恢复到室温，然后充分混匀后再使用。

- 向 1~1000 个细胞中加入 4 µl Cell Lysis Buffer，用移液器吹打 10~15 次，然后室温放置 5 min 使细胞充分裂解。
- 向上述裂解产物中加入 10 µl 的 2× Pre-Amp Mix 和所需扩增的所有基因的正反向预扩增引物各 0.2 µl (10 µM)，然后加 ddH₂O 补足到 20 µl。假如对于一个细胞样品需要扩增两个基因 (G1、G2)，则配制反应体系如下表：

成分	20 µl 体系
Cell Lysates (containing 1~1,000 cells)	4 µl
2× Pre-Amp Mix	10 µl
G1 的正向预扩增引物(10 µM)	0.2 µl
G1 的反向预扩增引物(10 µM)	0.2 µl
G2 的正向预扩增引物(10 µM)	0.2 µl
G2 的反向预扩增引物(10 µM)	0.2 µl
ddH ₂ O (灭过菌的)	补足到 20 µl

3. 上述反应体系配制好，一定要用移液器吹打10~15次使其充分混匀，然后按照下面的程序进行逆转录和预扩增同步反应：

温度	时间	循环数
50°C	15 min	1 cycle
95°C	5 min	1 cycle
95°C	15 sec	14 cycles
60°C	15 sec	
72°C	1 min	

4. 关于预扩增引物设计：

A. 建议 qPCR 引物和预扩增引物在设计时靠近 mRNA 的 3' 端，以便确保被充分扩增。

B. 预扩增引物和 qPCR 引物最好进行跨外显子设计：即其扩增产物跨 1 个外显子。

C. 需要将 qPCR 扩增产物所在的序列包含在内（即预扩增引物需要在 qPCR 引物的外侧，上游更偏 5' 端，下游更偏 3' 端）。

5. 预扩增后的产物一般稀释 5~10 倍之后再使用。如果预扩增的产物稀释 5 倍，即向 20 μl 的预扩增产物中加入灭过菌的 ddH₂O 80 μl 充分混匀后，按照如下表格进行 qPCR 反应体系的配制：

成分	10 μl 体系	20 μl 体系
2× SYBR Green qPCR Master Mix	5 μl	10 μl
Template (diluted pre-amplification product)	1 μl (0.5 ~ 2 μl)	2 μl (1 ~ 4 μl)
正向引物(10 μM)	0.2 μl	0.4 μl
反向引物(10 μM)	0.2 μl	0.4 μl
50× ROX Reference Dye	0.2 μl	0.4 μl
ddH ₂ O (灭过菌的)	补足到 10 μl	补足到 20 μl

五、常见问题及解决方法

1. 如果 qPCR 结果内参 Ct 值明显偏大，则预扩增循环数可以由 14 个 Cycle 增加 3 个循环到 17 个 Cycle。

2. 如果 qPCR 结果 Ct 值明显偏小（例如内参 Ct 值小于 14），说明模板细胞数偏多，或者基因丰度过高，可以将细胞数稀释 10 倍，取 100 个左右细胞作为模板进行实验（通常合理的内参 Ct 值范围为 14~20）。