

EZ-press Cell to cDNA Kit PLUS III

说明书

Cat. No.: B0015

一、产品简介

EZ-press Cell to cDNA Kit PLUS III 提供了一种简单快速的方法，无需 RNA 分离即可从培养细胞中获得 cDNA。本产品得到的 cDNA 可在 -80°C 储存长达 3 个月且 Ct 值无明显变化，可很好的替代 TRIzol 法进行基因表达定量分析。与 TRIzol 法相比，本产品具有简单快速、稳定性高和灵敏度强等特点，从培养细胞到 cDNA 最快仅需 25 min，最低检测下限为 1000 个细胞。

二、产品组分

| 组分 \ 货号 (规格) | B0015-S (10 Rxns, 20µl/Rxn) | B0015 (100 Rxns, 20µl/Rxn) |
|---------------------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|
| Cell Lysis Buffer | 1.1 ml | 5.5 ml |
| gDNA Remover | 24 µl | 240 µl |
| 4× CC RT Mix | 55 µl | 550 µl |
| ddH ₂ O (Nuclease ⁻) | 1 ml | 1 ml × 2 |

三、保存条件

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

四、自备材料

水平摇床 (可选)、RNase-free PCR 管或八连管、RNase-free 枪头和 PCR 仪等。

五、注意事项

1. 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离心管管中进行裂解；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无酶离心管中，离心去除 PBS 后再加入裂解液裂解。
2. 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。可参考细胞密度与裂解液添加量参考表。
3. 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。
4. 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。
5. 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。
6. 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

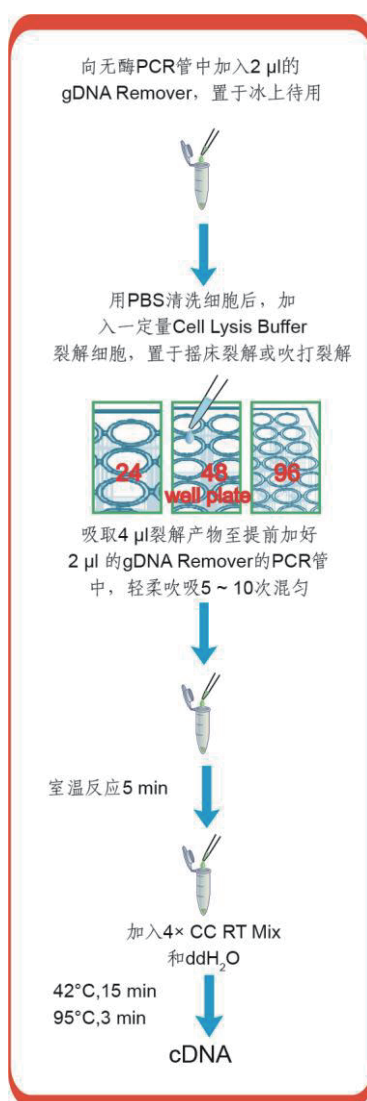
的裂解液比例后再进行正式实验。

7. 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。
8. 为了您的安全和健康，请穿戴实验服、一次性乳胶手套、一次性口罩、使用 RNase-free 耗材，避免 RNase 污染。

细胞密度与裂解液添加量参考表

| 培养板 | 24 孔板 | | 96 孔板 | | 384 孔板 |
|------|-------------|-------------|------------|------------|-----------------|
| 细胞密度 | 55 ~ 65% | 80 ~ 100% | - | | - |
| 细胞数 | ~30 万 | ~50 万 | 2 ~ 8 万 | 8 ~ 15 万 | - |
| 裂解液 | 150 μ l | 200 μ l | 30 μ l | 50 μ l | 20 ~ 25 μ l |

六、实验流程



七、操作步骤

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 μ l 的 gDNA Remover，置于冰上待用。

2A. 对于贴壁细胞

a) 吸去培养基，沿侧壁小心加入约 200 μ l 的 1 \times PBS，轻轻晃动几下。

b) 依次裂解细胞（可选择水平摇床裂解或吹打裂解，建议优先用水平摇床裂解，更简单快速）

水平摇床裂解：吸净 PBS，若样品数较多，应分批操作，按照 50 μ l/10 万细胞的量加入 Cell Lysis Buffer，置于摇床上室温摇 5 ~ 10 min（转速 150 ~ 600 rpm），用移液器吹打 10 ~ 20 下混匀，立即吸取 4 μ l 裂解产物（4 ~ 8 μ l，具体须根据不同的样品测试优化）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。

吹打裂解：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 15 ~ 20 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，从而避免产生过多气泡）【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（4 ~ 8 μ l）至提前加好 2 μ l 的 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处理。

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 1 \times 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 $1 \times 10^5 \sim 3 \times 10^5$ 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 $1 \times 10^5 \sim 3 \times 10^5$ 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。

c) 细胞裂解后，立即吸取 4 μ l 裂解产物（4 ~ 8 μ l）至提前加好 2 μ l gDNA Remover 的 PCR 管中，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 $^{\circ}$ C）放置 5 min，以充分去除基因组 DNA（gDNA）。

4. 细胞裂解和去 gDNA 完成后，裂解产物放置在冰上，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。裂解产物冰上放置的时间不应超过 30 min）。

逆转录

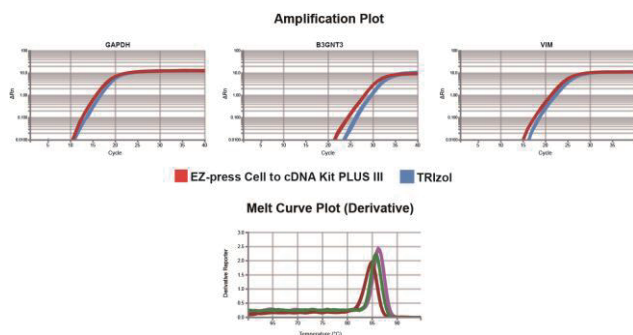
5. 根据下表配制逆转录反应体系，在上述细胞裂解产物中加入 4 \times CC RT Mix 和 ddH₂O(Nuclease⁻)。

| 组分 | 体积 (20 μ l) |
|---------------------------------------------|----------------------------|
| Cell Lysate | 6 μ l (6 ~ 10 μ l) |
| 4 \times CC RT Mix | 5 μ l |
| ddH ₂ O (Nuclease ⁻) | 补足至 20 μ l |

6. 逆转录体系配制好后，Vortex 20 S 使之充分混匀（建议优先采用此方法，如果逆转录体系是在 96 孔板配制，需盖好封板膜，并用塑料薄板压紧封板膜，Vortex 30 sec ~ 1 min 使之充分混匀）；也可通过吹打混匀，吹打时需使用移液器吹吸 20 ~ 30 次使之充分混匀（建议混匀时将移液器量程调到 16 μ l）。【注意：逆转录上机反应前充分混匀很重要】。反应体系通过 Vortex 或吹打混匀后，瞬时离心，然后再进行逆转录反应，逆转录反应程序为 42 $^{\circ}$ C 反应 15 min；95 $^{\circ}$ C 反应 3 min，逆转录完成后置于冰上。

7. 逆转录产物可直接作为 qPCR 模板使用，也可根据基因表达丰度进行稀释（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。**关于 cDNA 的用量：**在 20 μ l qPCR 反应体系中：模板 cDNA 如不稀释建议用 1 μ l（最多不超过 2 μ l）；如果稀释 5 倍建议用 5 μ l；建议用 10 μ M 的正反向引物各 0.4 μ l。

八、代表性实验结果



由上图可见，EZ-press Cell to cDNA Kit PLUS III 得到的 cDNA 的 qPCR 结果与 TRIZOL 方法高度一致。

九、常见问题及解决方案

| 常见问题 | 可能原因 | 解决方案 |
|------------------------------------------------------|-----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 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。 | 试剂或引物出现问题 | 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。 |
| | 操作不当 | 根据注意事项检查下操作步骤是否存在问题。 |
| | | 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 |
| | | 对于扩增结果异常的情况，需确保每 50 μ l 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（建议实验前先行预实验，以确定最佳细胞数量）。 |
| 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。 | 细胞量太少 | 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 μ l Cell Lysis Buffer 来裂解 |
| | 引物添加量太低 | 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 |
| | 模板量太低 | 裂解后可以增加裂解产物的量到最大 8 μ l，加入 2 μ l gDNA Remover，吹打混匀，室温放置 5 min，然后用于逆转录。 |