

EZ-press Fast Color Cell to cDNA Kit

说明书

Cat. No.: B0016C

一、产品简介

EZ-press Fast Color Cell to cDNA Kit 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，最快仅需 13 min。裂解细胞时只需去除培养基，PBS 清洗细胞一次，即可直接加入裂解液进行裂解，裂解产物可直接用于逆转录。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。

本产品的 4× Fast Color CRT Mix 含有蓝色惰性染料，它可与含有红色惰性染料的 2× Color SYBR Green qPCR Master Mix (A0012、A0012-R1、A0012-R2) 一起使用，也可与本公司的探针法 qPCR 试剂配套使用 (如 EZ3304-R2)。在 qPCR 反应中，将本产品获得的蓝色 cDNA 与 2× Color SYBR Green qPCR Master Mix 混合在一起，溶液会变成紫色。这在移液点板时提供了视觉辅助，降低了移液错误的风险。此外，染料不会影响 qPCR 反应的特异性或灵敏度。建议将上述推荐的试剂盒配套使用以获得最佳的效果。

二、产品组分

货号 (规格)	B0016C-S (10 Rxns, 20µl/Rxn)	B0016C (100 Rxns, 20µl/Rxn)	B0016C-L (1000 Rxns, 20µl/Rxn)	B0016C-XL (4000 Rxns, 20µl/Rxn)
Cell Lysis Buffer	1.1 ml	6 ml	6 ml × 10	(6 ml × 40)/Bag
gDNA Remover	24 µl	240 µl	1.2 ml × 2	(1.2 ml × 8)/Bag
4× Fast Color CRT Mix	55 µl	550 µl	2.75 ml × 2	(2.75 ml × 8)/Bag
ddH ₂ O (Nuclease ⁻)	1 ml	1 ml × 2	20 ml	(20 ml × 4)/Bag

三、保存条件

本产品的所有组分建议置于 -20°C 保存，可保存 24 个月。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 96 或 384 孔板培养的贴壁细胞；对于悬浮细胞，推荐使用 EZ-press Suspension Cell to cDNA Kit (货号: B0017C)。
2. 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。
3. 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。
4. 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；如果在超净台中操作，建议不要开风机，

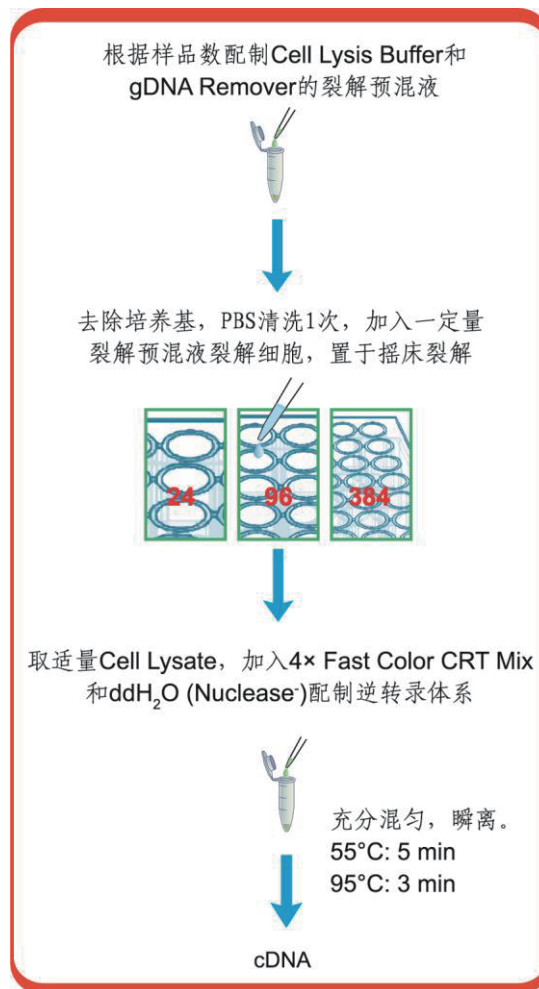
以免吹干细胞导致 RNA 严重降解。

5. 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。
6. 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。

细胞密度与裂解预混液添加量参考表

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	$1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^5$	-
裂解液	150 μ l	200 μ l	30 ~ 50 μ l	20 ~ 25 μ l

六、实验流程



七、操作步骤

细胞裂解

1. 使用前，将 Cell Lysis Buffer（裂解液）解冻后上下颠倒 10 次使之充分混匀，然后恢复到室温备用，请勿涡旋振荡；将 4× Fast Color CRT Mix 和 gDNA Remover 解冻后上下颠倒 10 次使之充分混匀（非常重要），然后短暂离心至管底，放在冰上备用。
2. 根据样品数按照下表推荐的单个样品用量配制裂解预混液，充分混匀后置于室温备用。

组分	孔板类型	96 孔板	384 孔板
Cell Lysis Buffer		50 μ l	25 μ l
gDNA Remover		2 μ l	1 μ l

注：通常可在样品数的基础上增加 5% ~ 10% 的量进行配制。

3. 吸去培养基（在加药处理的情况下，为了避免药物对反应体系的影响，建议用 PBS 清洗细胞一次，每个孔沿侧壁缓缓加入约 200 μ l 的 PBS，轻轻晃动几下，弃去 PBS），96 孔板按 50 μ l/孔，384 孔板按照 25 μ l/孔，将裂解预混液加入细胞样品孔中，接着将孔板置于水平摇床上室温摇 5 ~ 10 min（转速 150 ~ 200 rpm），然后用移液器吹打 10 ~ 20 下混匀，裂解产物（Cell Lysate）置于冰上备用。

注：去除培养基后应立即加入 PBS，去除 PBS 后应立即加入裂解预混液，防止细胞被晾干了导致 RNA 降解。

逆转录

4. 根据下表配制逆转录反应体系。逆转录体系配制好后，Vortex 20 sec 使之充分混匀（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）【建议优先采用此方法】。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。

组分	体积（20 μ l）
Cell Lysate	6 μ l (4 ~ 8 μ l)
4× Fast Color CRT Mix	5 μ l
ddH ₂ O (Nuclease-)	补足至 20 μ l

5. 逆转录反应条件为：55°C 反应 5 min，95°C 反应 3 min。
6. 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。

八、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	根据注意事项检查操作步骤是否存在问题。在加药处理的情况下，为了避免残留的药物对后续反应体系的影响，建议用 PBS 清洗细胞一次，然后进行细胞裂解。
		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（建议实验前先进行预实验，以确定最佳细胞数量）。
		对于细胞数较少 ($< 1 \times 10^4$) 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，裂解液中存在足量细胞，Cell Lysis Buffer 用量最少可为 5 μ l。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。
	逆转录加样后未充分混匀。逆转录体系加样完成后，须按照说明书操作充分混匀，否则可能无法得到理想的实验结果。	
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 用于逆转录。