

版本号: KR121221

FastLine Cell cDNA Kit

FastLine细胞到cDNA快速制备试剂盒

目录号: KR105

产品内容

产品组成	KR105 (50 rxn)
Buffer FCW	25 ml
Buffer FCP	10 ml
gDNA Wipeout Buffer (7×)	100 µl
F-Quant Reverse Transcriptase	50 µl
Quantiscript RT Buffer (5×)	200 µl
RT Primer Mix	50 µl
RNase-Free ddH ₂ O	1.0 ml

储存条件

Buffer FCW 和Buffer FCP在室温（15-25℃）保存。其他FastLine Cell cDNA Kit试剂需要在-20℃条件下保存。

产品简介

FastLine Cell cDNA Kit提供了一个高效快速简单的从培养细胞直接到cDNA第一链合成的方法。整个操作过程简单快速，无需RNA纯化和RNase H消化的过程。试剂盒提供洗涤液和裂解缓冲液，用于制备裂解液并稳定RNA，此外配合有gDNA Wipeout Buffer可去除基因组DNA污染，可快速、高效地合成cDNA。

FastLine Cell cDNA Kit的优势：快速制备cDNA，无需RNA纯化工作，可在45 min内从细胞到cDNA，用于qRT-PCR。

- 快速性：从细胞到cDNA，操作过程简便快速；
- 方便性：可同时处理多个样本；
- 灵敏性：高灵敏度检测低丰度转录本；
- 高效性：无gDNA污染，确保只检测RNA分子；

应用范围

适用于两步法RT-PCR检测。

可应用于如：验证siRNA介导的基因沉默；评估药物影响；检测基因调控。

注意事项

1. 本产品可用于处理贴壁细胞、悬浮细胞和冻存细胞。以下操作步骤以24孔贴壁培养细胞为例，在24孔细胞板中细胞量为 $\leq 4 \times 10^4$ /孔。一般来说，细胞的数量与细胞的类型和培养条件有关，不同的培养板所需细胞量不同，详见表1。

表1. 不同的细胞培养板中细胞量及各Buffer的体积

细胞培养板	细胞培养板中种植细胞量/孔	Buffer FCW的体积/孔	Buffer FCP的体积/孔
384孔培养板	5×10^3	25 μ l	12.5 μ l
96孔培养板	1×10^4	100 μ l	50 μ l
48孔培养板	2×10^4	250 μ l	100 μ l
24孔培养板	4×10^4	500 μ l	200 μ l
12孔培养板	8×10^4	1000 μ l	400 μ l
6孔培养板	1×10^5	2000 μ l	1000 μ l

2. 为了得到更佳效果，反转录请在冰上操作。
3. 反转录反应之后，需将此体系进行95 $^{\circ}$ C，3 min灭活。
4. 该产品最佳使用效果可以处理10 pg-1 μ g 的RNA。如果处理量大于1 μ g，则应该根据各试剂的最佳使用量相应的增加体积。

操作步骤

贴壁细胞选择(a)操作步骤：悬浮细胞选择(b)操作步骤：冻存细胞选择(c)操作步骤。

- (a) 如果细胞是贴壁细胞：取适量新鲜的贴壁细胞（如24孔细胞培养板中，每孔细胞培养板中种植细胞数为 1×10^4 细胞）。

(b) 如果细胞是悬浮细胞：取适量悬浮细胞于管中，进行离心，250xg，离心5 min。

(c) 如果细胞是冻存细胞：取适量冻存细胞于管中，直接进行第三步操作，过程同悬浮细胞。
- (a) 吸掉细胞培养板中的培养基。

(b) 离心后，弃培养基。
- (a) 每孔细胞培养板中加入500 μ l Buffer FCW。注意：孵育时间不要过长。

(b) 每管中加入500 μ l Buffer FCW。注意：漂洗时间不要过长。
- (a) 吸掉Buffer FCW。

(b) 250xg，离心5 min，离心后弃FCW。
- (a) 每孔细胞培养板中加入200 μ l Buffer FCP，室温孵育5-10 min。

(b) 每管中加入200 μ l Buffer FCP，室温孵育5-10 min。
- 把上述裂解物 (FastLine lysate) 放入合适的管中。准备进行下一步操作。如果不马上使用可以把裂解物(FastLine lysate)存放于 -80°C 。
- 室温准备下列溶液：上述裂解物(FastLine lysate)、RNase-Free ddH₂O、gDNA Wipeout Buffer(7x)、Quant Reverse Transcriptase、Quantiscript RT Bufer (5x)、和RT Primer Mix。注意：Quant Reverse Transcriptase、Quantiscript RT Bufer (5x)、和RT Primer Mix融化后放于冰上。

8. 按下表进行gDNA去除反应

组成成分	体积
gDNA Wipeout Buffer(7x)	2 μ l
FastLine lysate	1-4 μ l
RNase-Free ddH ₂ O	补足至14 μ l
Total Volume	14 μ l

9. 42°C 孵育5 min，孵育完后马上放于冰上。

10. 按下表进行反转录操作（冰上操作）

组成成分	体积
F-Quant Reverse Transcriptase	1 μ l
Quantiscript RT Bufer (5x)	4 μ l
RT Primer Mix	1 μ l
FastLine lysate（上步所得）	14 μ l
Total Volume	20 μ l

11. 42°C 孵育30 min。

12. 95°C，3 min。

13. 得到cDNA，可用于后续荧光定量检测。

可能遇到的问题

如果得率低或无得率，分析原因可能如下：

1. 细胞量的选择：需要根据自己的细胞类型和培养条件，设计不同的细胞浓度，从而筛选最佳的细胞量。
2. 细胞清洗步骤：一定要按说明书进行操作，用洗涤液FCW进行清洗细胞，从而去除细胞外的杂质。
3. 细胞裂解液量的选择：严格按照说明书进行。
4. 反转录操作：一定要在冰上进行操作。
5. 用于定量PCR的反转录产物的加量：一般小于终体积的10%，否则会影响扩增效率和线性关系。
6. 反转录温度的选择：一般来说建议用42℃，但如果RNA富含二级结构时可用50℃。Reverse Transcriptase 随着温度的升高活性会降低，因而会影响cDNA产量。
7. 试验操作过程中的小细节：小心操作。
8. RNA变性：不需要模板RNA的变性，如果变性会影响RNA的完整度。
9. 反转录时间：一般建议孵育30 min。
10. 引物的选择：在反转录中如果使用特异性引物，需要确保引物的浓度和完整度，可以设计不同的引物浓度来筛选出最佳浓度；如果使用试剂盒中的混合引物，需按说明书操作。

浓缩国际权威精华， 铸就TIANGEN优秀品质！

TIANGEN为您提供国际化标准的生物学产品和服务：

- PCR、RT-PCR系列
- 核酸DNA、RNA分离纯化系列
- DNA分子量标准
- 克隆载体、感受态细胞
- 细胞生物学产品
- 蛋白分子量标准
- 蛋白质染色、检测及定量相关产品