

# TransScript® Uni Cell to cDNA Synthesis SuperMix for qPCR

使用前请仔细阅读说明书

目录号: AC301

版本号: Version 2.0

保存: -20℃保存两年。

## 产品说明

本产品利用独特的裂解液裂解细胞，裂解物无需纯化，直接用于反转录反应。在同一反应体系中，合成第一链cDNA的同时去除RNA模板中的基因组DNA，适用于从细胞样品中直接制备可用于qPCR的cDNA。

## 试剂盒组成

Component	AC301-01 (25 rxns)
C to C Lysis Buffer	2×1.25 ml
TransScript® C to C RT Enzyme Mix	25 µl
5×TS C to C RT Buffer	100 µl
20×No RT Control Enzyme Mix	10 µl
RNase-free Water	250 µl

## 操作步骤

### 细胞裂解

a、48、96或384孔板贴壁细胞

不同孔板的细胞数量以及Buffer用量

细胞培养板	收获时的细胞数/孔	PBS用量	C to C Lysis Buffer 用量
384-well	$1.25 \times 10^2 - 1 \times 10^4$	25 µl	12.5 µl
96-well	$5 \times 10^2 - 5 \times 10^4$	100 µl	50 µl
48-well	$1 \times 10^3 - 1 \times 10^5$	250 µl	100 µl

以下步骤以96孔板贴壁细胞为例

- 1、向96孔板中接种一定数量的细胞并培养，使收获时的细胞密度达到 $5 \times 10^2 - 5 \times 10^4$ 个细胞/孔。
- 2、用枪头尽量吸尽培养基。
- 3、向各孔中加入100 µl预冷的PBS，用枪头尽量吸尽PBS。
- 4、向各孔中加入50 µl C to C Lysis Buffer，室温 (22-25℃左右) 放置5分钟。
- 5、用枪头将各孔的细胞反复吸打后，转移至微量离心管中，75℃孵育5分钟，立即置于冰上。

b、其它孔板的细胞

- 1、对于贴壁细胞，按照细胞传代的操作，将细胞消化成单个细胞；对于悬浮细胞，直接从步骤2开始。
- 2、计数细胞，2-8℃，500×g离心5分钟，弃上清。
- 3、用1 ml预冷的PBS重悬细胞，2-8℃，500×g离心5分钟，小心弃上清。
- 4、用适量预冷的PBS重悬细胞，使细胞密度为 $1 - 10^4/\mu\text{l}$ 。
- 5、取10 µl细胞加入到40 µl的C to C Lysis Buffer中，室温 (22-25℃左右) 放置5分钟。
- 6、75℃温育5分钟，立即置于冰上。

(制备好的细胞裂解液，可直接进行下游的反转录反应；若暂时不用，可于-20℃保存2周或-80℃保存1个月。)



## 第一链cDNA合成和gDNA去除

### 1、加入

Component	Volume (RT Reaction)	Volume (No RT Control)
Cell Lysate	15 $\mu$ l	15 $\mu$ l
5 $\times$ TS C to C RT Buffer	4 $\mu$ l	4 $\mu$ l
<i>TransScript</i> <sup>®</sup> C to C RT Enzyme Mix	1 $\mu$ l	-
20 $\times$ No RT Control Enzyme Mix	-	1 $\mu$ l
Total volume	20 $\mu$ l	20 $\mu$ l

2、轻轻混匀，50 $^{\circ}$ C孵育5分钟。

3、85 $^{\circ}$ C加热 2 分钟失活。

**推荐qPCR 体系与条件** (以20  $\mu$ l反应体系为例)

Component	Volume	Final Concentration
Template	Variable	as required
Forward Primer (10 $\mu$ M)	0.4 $\mu$ l	0.2 $\mu$ M
Reverse Primer (10 $\mu$ M)	0.4 $\mu$ l	0.2 $\mu$ M
2 $\times$ <i>PerfectStart</i> <sup>®</sup> Green qPCR SuperMix	10 $\mu$ l	1 $\times$
Passive Reference Dye (50 $\times$ ) (optional)	0.4 $\mu$ l	1 $\times$
Nuclease-free Water	Variable	-
Total Volume	20 $\mu$ l	-

### qPCR (三步法)

94 $^{\circ}$ C 30 sec  
 94 $^{\circ}$ C 5 sec  
 50-60 $^{\circ}$ C 15 sec ★  
 72 $^{\circ}$ C 10 sec ★

} 40-45 cycles

### qPCR (两步法)

94 $^{\circ}$ C 30 sec  
 94 $^{\circ}$ C 5 sec  
 60 $^{\circ}$ C 30 sec ★

} 40 - 45 cycles

Dissociation Stage

### Dissociation Stage

对于ABI 仪器，荧光信号采集步骤(三步法中可以是退火或是延伸步骤)的时间如下

- ★使用ABI Prism7700/7900 时，采集时间设定为30 秒；
- ★使用ABI Prism7000/7300 时，采集时间设定为31 秒；
- ★使用ABI Prism7500 时，采集时间设定为34 秒；
- ★使用ABI ViiA 7 时，采集时间设定为至少19 秒。

• 高扩增效率选择三步法。

• 高特异性选择两步法。

### 注意事项

- 75 $^{\circ}$ C孵育在PCR仪上进行，预先将PCR仪加热至75 $^{\circ}$ C，再放入样品，孵育5分钟。
- 制备好的细胞裂解物，可于-20 $^{\circ}$ C保存2周或-80 $^{\circ}$ C保存1个月。

本产品仅供研究，不用于临床诊断。

版本号: V2.0-202407

服务电话 +86-10-57815020

服务邮箱 complaints@transgen.com

