

Hieff® Fast Cell Direct RT set (for sybr)

产品简介

Hieff® Fast Cell Direct SYBR Green RT-qPCR Kit 适用于对各种动物细胞进行 RNA 提取（如 cell line 化的贴壁细胞和悬浮细胞、原代培养细胞、各种干细胞、iPS 细胞等），无需提 RNA，可直接进行 qPCR 表达分析，用时短，操作简单，出错率低，最短只需 1.5 小时就可高效完成从模板制备到反转录反应及基因表达分析等步骤。该产品为染料法细胞直扩 RT-qPCR 试剂盒的反转录模块，为补充试剂。

产品信息

货号	16812ES40 / 16812ES60
规格	40 T / 100 T

组分信息

组分编号	组分名称	16812ES40	16812ES60
16812-A	4× Hifair® FCD RT Mix	200 μL	500 μL
16812-B	RNase Free H ₂ O	2 mL	5 mL

储存条件

长期保存时请于-25~-15°C保存，有效期 6 个月。

使用说明

1. 裂解产物的制备

- 1) 将试剂放置室温下融化，使用前上下颠倒，轻轻混匀，并轻微离心后使用，避免起泡。没有混匀试剂、使用振荡器混匀、未在冰上配置试剂等会导致反应性能下降。
- 2) 将细胞转移至离心管*，5000 rpm 离心 2 min 收集细胞**，充分吸除培养基。若贴壁细胞在 96 孔板中培养，可直接吸除培养基。
- 3) 各个孔内加入 FCD Washing Buffer 150 μL，吸打清洗细胞，5000 rpm 离心 2 min，吸尽 FCD Washing Buffer。
- 4) 各孔中加入 48 μL FCD Lysis Buffer 溶液，2 μL DNase I 溶液，室温吸打混匀后静置 5 min，孵育后加入 2.5 μL FCD Stop Solution***，吸打混匀 5 次左右，即可得到裂解产物****，细胞数量超过 1×10^5 cells 时可能会有裂解残留物属正常现象。

*50 μL 裂解体系适配细胞数的基本要求是每孔 1×10^4 ，该试剂盒可使用范围是 $1 \times 10^3 - 1 \times 10^6$ cells，若细胞数量较多，可适当等比例增加 FCD Lysis Buffer 溶液和 DNase I 溶液的用量。

**不同细胞的离心条件不同，请使用适合于所用细胞的离心速度进行离心。

***50 μL 的裂解液需加入 2.5 μL 的 FCD Stop Solution。依实验需要，加入裂解液量增大时需相应增大 FCD Stop Solution 的量。

****细胞裂解产物溶液长期保存时，请置于-25~-15°C。

2. 反转录

- 1) 室温融化 4× Hifair® FCD RT Mix 后轻微颠倒混匀，置于冰上并按下表配置反应体系：

组分	体积 (μL)	终浓度
----	---------	-----

4× Hifair® FCD RT Mix	5	1×
裂解产物*	x	-
RNase-free H ₂ O	Up to 20	-

表 1 反转录反应体系

*避免吸入细胞碎片，推荐使用量为 2-5 μl，最大不超过反应体系的 45%。

2) 移液器轻轻混匀上述配制的反应液，按下表程序进行反转录反应**：

反应温度	反应时间
55°C	15 min
85°C	5 min

表 2 反转录反应程序

**反转录温度推荐使用 55°C，对于高 GC 含量模板或者复杂模板，可将反转录温度提高到 60°C。反转录产物可直接进行下游 RT-qPCR 检测。为避免反转录体系对 qPCR 反应的抑制，得到合适的 Ct 值（10-35），可将产物稀释 10-1000 倍后使用。若短时间内不进行下游实验，可放置于-25~-15°C 保存。

3. 荧光定量 PCR

1) 体系配置

使用下列组份比例配制反应液（配制过程请于冰上进行）：

组分	体积 (μL)	终浓度
2× Hieff® FCD qPCR SYBR Master Mix	10	1×
Forward Primer (10 μM)	0.4	200 nM
Reverse Primer (10 μM)	0.4	200 nM
反转录产物*	x	-
RNase-free H ₂ O	Up to 20	-

表 3 qPCR 反应体系

*反转录产物的加入量不要超过 RT-qPCR 体积的 1/10。高浓度模板易导致非特异扩增，适当稀释 5-50 倍。模板推荐用量 4 μL，尽量不要超过 6 μL。反应性能较差时，可以在 0.2-1.0 μM 范围内调整引物浓度。

2) 荧光定量 PCR 常规扩增程序（推荐）

循环步骤	温度	时间	循环数
预变性	95°C	30 sec	1
变性	95°C	10 sec	35-40
退火/延伸	60°C	30 sec	
熔解曲线阶段	仪器默认设置		1

表 4 qPCR 反应程序（常规）

3) 荧光定量 PCR 快速扩增程序

实验条件允许时，也可使用快速程序进行扩增。

循环步骤	温度	时间	循环数
预变性	95°C	10 sec	1
变性	95°C	5 sec	40
退火/延伸**	60°C	10 sec	
熔解曲线阶段	仪器默认设置		1

表 5 qPCR 反应程序 (快速)

**退火/延伸温度、终延伸时间可根据实验要求适当调整。快速程序适用于绝大多数基因，个别复杂二级结构基因可尝试常规程序。

注意事项

1. 使用前，将冻存的各组分充分融解并轻轻混匀后使用。
2. 实验时，请尽量使用无污染的耗材，避免污染。
3. 本产品避免反复冻融，配制时应避免强光照射。
4. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。
5. 本产品仅作科研用途！