

For research use only

Version Number: 1.0

(96-well) QuickEasy™ Cell Direct RT-qPCR Kit–Taqman

For direct RT-qPCR using 10-10⁵ cells cultured by 96-well plate

试剂盒组成 (50 μL 裂解体系/20 μL RT 反应体系/20 μL qPCR 反应体系)		DRT-02021	备注
		96 T	
Part I	Buffer CL	5 mL	Cell Lysis
	Foregene Protease Plus II	100 μL	
	Buffer ST	500 μL	
Part II	DNA Eraser	100 μL	RT
	5x Direct RT Mix	400 μL	
	2x Direct qPCR Mix-Taqman	1 mL × 2	qPCR
	20x ROX Reference Dye	200 μL	
	RNase-Free ddH ₂ O	1.7 mL	
说明书		1 份	1 份

*：裂解部分试剂 DNA Eraser 在试剂盒 Part II；Cell Lysis、RT、qPCR 组分可单独购买。

产品简介

本产品采用独特的裂解缓冲体系可以快速地培养细胞样本中释放出 RNA，用于 RT-qPCR 反应，消除了费时费力的 RNA 纯化过程，只需 7 min 即可得到所需要的 RNA 模板，配合试剂盒提供的 5x Direct RT Mix、2x Direct qPCR Mix-Taqman 能够快速得到有效的实时定量 PCR 结果。

5x Direct RT Mix 和 2x Direct qPCR Mix-Taqman 具有很强的抑制物耐受性，能以待测样本的裂解液为模板，进行高效逆转和特异性扩增。该试剂包含福际独有的 RNA 高亲和性 Foregene Reverse Transcriptase，以及 Hot D-Taq DNA Polymerase、dNTPs、MgCl₂、反应缓冲液、PCR 优化剂和稳定剂，与裂解缓冲液配合使用能够快速简便地对样品进行检测，并具有灵敏度高、特异性强、稳定性好等特点。

该试剂盒针对 96 孔培养细胞进行微量体系裂解，具有很好的均一性和一致性；试剂盒组分提供 96 次裂解反应、96 次逆转录反应及 96×2 次 qPCR 反应，能满足 96 孔细胞整版一次性使用，避免试剂反复开启、冻融等操作带来的污染和试剂性能降低。

运输及储存条件

1. 运输条件：全程低温冰盒运输，保证试剂盒处于<4°C 状态。
2. 保存条件：试剂盒 Part I 保存在 2-8°C；Part II 保存于-20±5°C。

试剂盒组分信息

- ❖ Buffer CL：提供细胞裂解反应所需环境。
- ❖ Foregene Protease Plus II：在裂解缓冲液的环境下，裂解细胞，释放核酸。
- ❖ DNA Eraser：DNA 去除剂，去除基因组对后续实验的影响。
- ❖ Buffer ST：终止裂解液中的活性物质，避免对后续 RT 造成影响。
- ❖ 5x Direct RT Mix：包含福际生物专门研制的高 RNA 亲和性 Foreasy Reverse Transcriptase，以及 RNase Inhibitor、dNTPs、稳定剂、增强剂、优化剂及优化配比的逆转录引物(Random Primer、Oligo(dT)18 Primer)。
- ❖ 2x Direct qPCR Mix-Taqman：该试剂包含 Foreasy HS Taq DNA Polymerase、dNTPs、MgCl₂、反应缓冲液、PCR 优化剂和稳定剂。

注意事项：(请务必在使用试剂盒前仔细阅读注意事项)

- ◆ 注意实验的操作手法，避免样本间的交叉污染。
- ◆ 注意实验环境及用具清洁，避免 RNase 污染，造成 RNA 降解。
- ◆ 细胞裂解体系请新鲜配制，即配即用。
- ◆ 2x Direct qPCR Mix-Taqman 应避免反复冻融，否则会影响 PCR 效率。

操作指南

A: 样本 RNA 释放

1. 细胞预处理：用冷 PBS 洗涤细胞培养板，并进行细胞的裂解。
 - 1.1. 贴壁细胞：倾斜细胞培养板，使用移液器吸去孔中的培养基(培养基尽量吸除干净，以免影响后续裂解反应)。每孔中加入 50 μL 预冷的 1x PBS，切勿反复吹打，从孔中吸除 PBS。平板倾斜，尽量多的去除 PBS。继续执行步骤 2。
注意：确保细胞贴壁牢固，避免洗涤时出现大量细胞丢失。
 - 1.2. 悬浮细胞：进行细胞数量计数后，1000 ×g 离心 10 分钟，去除上清，收集细胞沉淀；加入 50 μL 预冷的 PBS 清洗，1000 ×g 离心 10 分钟，去除上清(尽量多的去除 PBS，以免影响后续裂解反应)。收集细胞沉淀，继续执行步骤 2。
注意：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。

2. 细胞裂解: 取出 Buffer CL, 使其温度平衡至室温, 加入 DNA Eraser 和 Foregene Protease Plus II, 按照下表 1 制备裂解体系: (裂解液新鲜配制, 即配即用)。

表 1: 裂解体系配制 (注意: 配制时请于冰上操作)

组分(细胞裂解预混液) 50 µL/孔	1 孔试剂用量	96 孔试剂用量
Buffer CL	48 µL	4608 µL
DNA Eraser	1 µL	96 µL
Foregene Protease Plus II	1 µL	96 µL

3. 吸取 50 µL 细胞裂解预混液于每孔中, 反复吹打 5-10 次或者平板混匀仪器混匀数秒, 室温 (20-25°C) 孵育 5 min。

注意: 为避免形成气泡, 吹打时请将移液器的刻度调至 50 µL 以下。细胞裂解后可能略显混浊, 属于正常现象。

4. 在上述液体中加入 5 µL Buffer ST, 反复吹打 5-10 次或者平板混匀仪器混匀数秒, 室温 (20-25°C) 孵育 2 min。

注意: 移液器枪头置于液面以下, 确保终止液加入裂解产物中, 为避免形成气泡, 吹打时请将移液器的刻度调至 50 µL 以下。

5. 裂解产物即用于后续的 RT-qPCR 实验, 若无法及时进行后续实验, 请置于冰浴上 (不能超过 2 hr), 也可于 -20°C 或 -80°C 保存 (不超过三个月)。

B: RT 体系配制

1. 取出 5x Direct RT Mix 置于冰浴上, 使其自然融化, 并轻柔混匀待用; 取出 RNase-Free ddH₂O 融化后置于冰浴上待用。按照下表 2-1 在冰上制备反应体系。

表 2-1: RT 反应体系配制

RT 体系添加内容	用 量	终浓度
5x Direct RT Mix	4 µL	1x
细胞裂解产物(RNA 模板)	4 µL	添加范围调整(10-40%)
RNase-Free ddH ₂ O	12 µL	
Total Volume	20 µL	

2. 体系配制完成后, 轻柔混匀并简短离心后按照下表 2-2 的反应条件进行 RT 反应。

表 2-2: RT 反应条件设置

步骤	温度	时间	内容
1	42°C	20 min	cDNA 合成
2	95°C	5 min	失活逆转录酶
3	4°C	N/A	反应完成后置于 4°C 待用或 -20°C 保存

3. 反应完成后, 反应产物置于冰上直接用于 qPCR, 长期保存请置于 -20°C 或 -80°C。

注意: 由于使用非纯化模板, 逆转录产物可能会出现白色沉淀, 属于正常现象, 瞬时离心取上清进行后续实验即可。

C: qPCR 反应体系配制

1. 取适量的 B 步骤制备的 cDNA 模板按照下表 3-1 制备反应体系。

注意: 用于后续 qPCR 检测时, 模板量占 qPCR 体系的 10-30%。如 20 µL 的 qPCR 体系中, 加入 2-6 µL 裂解液即可, 但不能超过 6 µL。

表 3-1: PCR 反应体系配制

RT 体系添加内容	用 量	终浓度
2x Direct qPCR Mix-Taqman	10 µL	1x
Forward Primer (10 µM)	0.8 µL	50-900 nM
Reverse Primer (10 µM)	0.8 µL	50-900 nM
Probe Primer (10 µM)	0.4 µL	200 nM
cDNA 模板(B 步骤所得)	4 µL	10-30%
RNase-Free ddH ₂ O	4 µL	
20x ROX Reference Dye *	-	-
Total Volume	20 µL	

*: 根据定量 PCR 仪器不同选择合适的 ROX Reference Dye 终浓度。常见定量 PCR 仪的最适 ROX Reference Dye 浓度见下表:

荧光定量 PCR 仪	ROX Reference Dye 终浓度
ABI PRISM7000/7300/7700/ 7900HT/Step One 等	1x (如 20 µL 体系, 加入 1 µL 20xROX Reference Dye)
ABI 7500/7500 Fast 和 Stratagene Mx3000P/Mx3005P/Mx4000 等	0.5x (如 20 µL 体系, 加入 0.5 µL 20xROX Reference Dye)

2. 根据优化好的 qPCR 条件(退火温度等)进行 qPCR 反应(反应条件见下表 3-2)。

注意: 尽量使用优化后的条件进行 qPCR 反应, 可以得到更好的结果。

表 3-2: qPCR 反应条件设置

步骤	温度	时间	循环数	内容
1	95°C	3 min	1	预变性
2	95°C	10 sec	40	循环中模板变性
3	60-65°C	30 sec		退火/延伸