

For research use only

Version Number: 1.0

QuickEasy™ Animal Tissue Direct RT-qPCR Kit-Taqman

For animal tissue direct RT-qPCR test.

试剂盒组成		DRT-04021	备注
(500 μL 裂解体系 / 20 μL RT 反应体系 / 20 μL qPCR 反应体系)		100 T	
Part I	Sample Grinding Tube	100 T	Tissue Lysis
Part II	Buffer DAL	45 mL	
	Foregene Protease (AT)	500 μL	
	Buffer ST	10 mL	
	Buffer NT	6 mL	
Part III	RNA Protectant	4.5 mL	RT-qPCR
	2× Direct RT Mix (AT)	1 mL	
	2× Direct qPCR Mix-Taqman	3 mL	
	20× ROX Reference Dye	400 μL	
	RNase-Free ddH ₂ O	1.7 mL	
说明书		1 份	

产品简介

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

该试剂盒具有很好的均一性和一致性；试剂盒组分提供 100 次裂解反应、100 次逆转录反应及 300 次 qPCR 反应，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℃状态。
2. 保存条件：试剂盒 Part I 置于常温保存；Part II 置于 2-8℃保存；Part III 置于-20±5℃保存。

试剂盒组分信息

- ❖ Buffer DAL：提供细胞裂解反应所需环境。
- ❖ Foregene Protease (AT)：在裂解缓冲液的环境下，裂解细胞，释放核酸。
- ❖ RNA Protectant：保护裂解释放的 RNA。
- ❖ 2× Direct RT Mix (AT):包含福际生物专门研制的高 RNA 亲和性 Foreasy Reverse Transcriptase，稳定剂、增强剂、优化剂及优化配比的逆转录引物。
- ❖ 2× Direct qPCR Mix-Taqman：具有很强的抑制物耐受性, 包含 Foreasy HS Taq DNA Polymerase、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。

操作指南

A：样本 RNA 释放

1. 裂解体系配制：取出 Buffer DAL，Foregene Protease (AT)、RNA Protectant，混匀后按照下表 1 制备裂解体系（裂解预混液即配即用）。

表 1：裂解体系配制

组分（组织裂解预混液）500 μL/管	单个反应孔试剂用量
Buffer DAL	450 μL
Foregene Protease (AT)	5 μL
RNA Protectant	45 μL

注意：组分 Buffer DAL 为无色至乳白色悬浊液。

2. 组织裂解：取出 Sample Grinding Tube，向每管中加入 500 μL 上述裂解混合液后置于冰上放置，称量 10 mg 小鼠组织置于含有裂解混合液的破碎管中（确保组织在液面以下）。使用组织破碎仪低温（2-8℃）振荡破碎至无组织碎片，破碎后立即置于冰上备用。

3. 向上述裂解液中加入100 μL Buffer ST混匀，冰上放置备用。
4. 裂解产物可立即用于后续 RT-qPCR 实验。若无法及时进行后续实验，请将产物置于冰上（不能超过 30 min），也可于-80℃保存（不超过三个月）。

B：RT 反应体系配置

1. 取 5 μL A 步骤制备的裂解产物加入 60 μL Buffer NT 进行中和，中和后冰上放置备用（不能超过 30 min）。
2. 取出 2 × Direct RT Mix (AT)，按照下表 2-1 制备 RT 反应体系。

注意：用于 RT 时，模板为中和后的裂解产物，裂解产物加入 2-4 μL 即可，但不能超过 4 μL。

表 2-1：RT 反应体系配制

RT 体系添加内容	单个反应孔用量
2 × Direct RT Mix (AT)	10 μL
稀释 10 倍的裂解产物	4 μL
RNase-Free ddH ₂ O	To 20 μL

3. 将上述 RT 体系涡旋混匀并瞬时离心后，置于普通 PCR 仪样品槽，按照下表 2-2 设置反应条件进行 RT 反应。反应完成后，RT 产物置于冰上直接用于 qPCR，长期保存请置于-20±5℃或-80℃。

表 2-2：RT 反应条件设置

步 骤	温 度	时 间	内 容
1	42℃	20 min	cDNA 合成
2	95℃	5 min	失活逆转录酶
3	4℃	N/A	反应完成后置于 4℃待用或-20℃保存

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，吹打混匀后进行后续实验即可。

C：qPCR 反应体系配置

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% ~ 20% (V/V)，如 20 μL 的 qPCR 体系中，加入 2-4 μL 模板即可，但不能超过 4 μL。

表 3-1：PCR 反应体系配制

PCR 体系添加内容	单个反应孔用量	终浓度
2× Direct qPCR Mix-Taqman	10 μL	1×
Forward Primer (10 μM)	0.8 μL	100-600 nM
Reverse Primer (10 μM)	0.8 μL	100-600 nM
Probe Primer (10 μM)	0.4 μL	50-300 nM
cDNA 模板（B 步骤所得）	4 μL	10% ~ 20%
20× ROX Reference Dye *	-	-
RNase-Free ddH ₂ O	To 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	1× （如 20 μL 体系，加入 1 μL 20×ROX Reference Dye）
ABI 7500/7500 Fast 和 Stratagene Mx3000P/Mx3005P/Mx4000 等	0.5× （如 20 μL 体系，加入 0.5 μL 20×ROX Reference Dye）

2. 按照下表 3-2 设置 qPCR 反应条件并进行 qPCR 反应。

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℃	3 min	1	预变性
2	95℃	10 sec	40	循环中模板变性
3	60-65℃*	30 sec		退火/延伸

*：此步骤收集荧光