



QuickEasy™ Cell Direct RT-qPCR Kit -Taqman

Cat.No.DRT-01021/01022

For cell direct RT-qPCR using $\leq 1000,000$ cells

For performing RT-qPCR directly from cells without prior RNA purification

For research use only



目 录

产品介绍	3
产品特点	3
试剂盒应用	3
试剂盒局限性	4
产品质量控制	4
试剂盒内容	5
储存条件	5
试剂盒组分信息	6
注意事项	6
操作前准备事项	7
实验材料和设备	7
安全性	7
操作指南	8
● 细胞直接 RT-qPCR 操作步骤	8
Real Time PCR 引物设计原则	12
附表 1: 细胞直接 RT-qPCR 试剂盒组分补充包	13

产品介绍

本产品采用独特的裂解缓冲体系可以快速的从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 7min 即可得到所需要的 RNA 模板，配合试剂盒提供的 5× Direct RT Mix 、 2× Direct qPCR Mix-Taqman 能够快速有效的得到实时定量 PCR 结果。

5× Direct RT Mix 和 2× 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。该试剂包含福际高 RNA 亲和性 Foregene Reverse Transcriptase、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。

产品特点

- ◆ 简单、有效的 Cell Direct RT 技术，只需 7min 即可得到 RNA 样本。
- ◆ 样品需求量小，最少 10 个培养细胞即可进行实验。
- ◆ 高通量，可以快速对 384、96、24、12、6 孔板等培养细胞进行 RNA 的获取。
- ◆ DNA Eraser 能够快速去除释放的基因组，大大降低对后续实验结果的影响。
- ◆ 优化的 RT 及 qPCR 体系，使两步法 RT-PCR 具有更高效的逆转录、特异性和更强的 RT-qPCR 反应抑制物耐受性。

试剂盒应用

- ◆ 适用范围：培养细胞。
- ◆ 样本裂解释放的 RNA：仅用作两步法 RT-qPCR 模板。
- ◆ 试剂盒可用于以下用途：基因调控表达分析、等位基因检测、药物筛查等。

试剂盒局限性

- ◆ 扩增片段≤300bp。
- ◆ 试剂盒用于新鲜培养细胞。

产品质量控制

按照福际生物试剂盒质量检测体系标准(FOREGENE's Total Quality Management System), 每一批次的培养细胞直接 RT-qPCR 系列试剂盒都严格进行多次测试, 确保每一批次试剂盒质量的可靠性和稳定性。

试剂盒内容

QuickEasy™ Cell Direct RT-qPCR Kit-Taqman 培养细胞直接 RT-qPCR 试剂盒				
试剂盒组成		DRT-01021	DRT-01022	备注
20 μL qPCR Reaction System		200 T	1000 T	
Part I	Buffer CL	4 mL	20 mL	Cell Lysis
	Foregene Protease Plus II	80 μL	400 μL	
	Buffer ST	400 μL	1 mL × 2	
Part II	DNA Eraser	80 μL	400 μL	
	5× Direct RT Mix *	160 μL	800 μL	RT
	2× Direct qPCR Mix-Taqman *	1 mL × 2	1.7 mL × 6	qPCR
	20× ROX Reference Dye	40 μL	200 μL	
	RNase-Free ddH ₂ O	1.7 mL	10 mL	
说明书		1 份	1 份	

*:Cell Lysis、5× Direct RT Mix、2× Direct qPCR Mix-Taqman 可单独购买, 详细信息见附表 1(PAGE 13)。

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

本试剂盒 Part I 保存在 4°C; Part II 保存于 -20°C。

- ❖ Foregene Protease Plus II 应置于 4°C 保存, 切勿冻存于 -20°C。
- ❖ 试剂 2× Direct qPCR Mix-Taqman 保存于 -20°C; 若频繁使用, 也可置于 4°C 短期保存(限 10 天内用完)。

试剂盒组分信息

- ◆ Buffer CL: 提供细胞裂解反应所需环境。
- ◆ Buffer ST: 终止裂解液中的活性物质, 避免对后续 RT 造成影响。
- ◆ DNA Eraser: DNA 去除剂, 去除基因组对后续实验的影响。
- ◆ 5x Direct RT Mix: 包含福际生物专门研制的高 RNA 亲和性 Foregene Reverse Transcriptase、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)。
- ◆ Foregene Protease Plus II: 在裂解缓冲液的环境下, 裂解细胞, 释放核酸。
- ◆ 2x Direct qPCR Mix-Taqman: 该试剂包含福际生物 Hot D-Taq DNA Polymerase、dNTPs、MgCl₂、反应缓冲液、PCR 优化剂和稳定剂。
- ◆ 20x ROX Reference Dye: 一般用于 ABI、Stratagene 等公司的 Real Time PCR 扩增仪上, 用于调整 PCR 加样误差所引起的 PCR 管与管之间的差异。不同仪器所需 20xROX Reference Dye 浓度不同, 用户可以根据仪器的推荐浓度添加。
- ◆ RNase-Free ddH₂O: 无 RNase 灭菌超纯水, 用于两步法 RT-qPCR 反应。

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。
- ◆ 取用新鲜或细胞形态保存完好的细胞样本, 切勿使用反复冻融的细胞样本。
- ◆ 5x Direct RT Mix 、2x Direct qPCR Mix-Taqman 应避免反复冻融, 否则会影响逆转录及 PCR 效率。

操作前准备事项

使用本试剂盒前，请务必仔细阅读说明书。培养细胞直接 RT-qPCR 试剂盒操作简单、方便、快速，说明书提供了整个试剂盒的完整信息和正确使用方法。请在使用前准备好必要的实验材料和设备。

实验材料和设备

- ◆ 培养细胞。
- ◆ 1.5 mL 或 2 mL 、RNase-/DNase-Free 离心管、RNase-/DNase-Free 枪头、0.2 mL 无菌 qPCR 管。
- ◆ qPCR 仪、移液器、台式离心机($\geq 13,400 \times g$)(根据实验需求)等。

安全性

- ◆ 本产品仅供科研使用，请勿用于医药、临床医学、食品及化妆品等用途。
- ◆ 使用化学品时，穿戴合适的实验服，手套，防护眼镜等。

操作指南

细胞裂解体系、RT 体系、qPCR 反应液补充包均可单独购买，详细信息见附表 1(PAGE 13)。

培养细胞直接 RT-qPCR 操作步骤

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(10^6), 10^6 以上细胞量，建议使用 Foregene Cell Total RNA Isolation Kit(DE-03111)或 Animal Total RNA Isolation Kit(DE-03011)进行 RNA 提取纯化。

1.1. 贴壁细胞(以 24 孔板为例)

1.1.1. 判定每孔的细胞数量，确定细胞数量为 1×10^5 个，使用移液器吸去培养皿中的培养基。

1.1.2. 加入 200 μ L 预冷的 $1 \times$ PBS 于每孔中，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。

1.1.3. 不同细胞数量或培养皿参照表 1-1 在细胞培养皿中加入预冷的 $1 \times$ PBS 进行细胞清洗。

表 1-1: 不同数量细胞使用 PBS 剂量

培养板类型	细胞数量/孔	$1 \times$ PBS/孔
6孔	1×10^6	1000 μ L
12孔	2×10^5	400 μ L
24孔	10^5	200 μ L
96孔	10^4	50 μ L
384孔	5×10^3	25 μ L

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. 悬浮细胞或者非多孔板培养的贴壁细胞

1.2.1. 非多孔板培养的贴壁细胞(悬浮细胞从下 1.2.2 步骤开始)，按照正常细胞收集方法对细胞收集及分离，置于培养板或离心管中；如果使用胰酶消化，需要离心收集细胞并去除残留的胰酶，加入 PBS 重悬细胞，使细胞分散成单个细胞。

1.2.2. 进行细胞数量计数后，分装细胞 1×10^5 个至离心管中，1000 \times g 离心 10min，收集沉淀细胞。

1.2.3. 向离心管中加入 200 μ L PBS 中，切勿反复吹打，直接吸除 PBS，继续执行步

骤 2。(若细胞不易沉淀且再次重悬, 可进行 1000 ×g 离心 10min 弃上清后, 细胞沉淀继续执行步骤 2)

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 1-2 制备裂解体系: (裂解液新鲜配制, 即配即用)。

表 1-2: 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)	6 孔板	12 孔板	24 孔板	96 孔板	384 孔板
	1000 μL/孔	400 μL/孔	200 μL/孔	50 μL/孔	25 μL/孔
Buffer CL	960 μL	384 μL	192 μL	48 μL	24 μL
DNA Eraser	20 μL	8 μL	4 μL	1 μL	0.5 μL
Foregene Protease Plus II	20 μL	8 μL	4 μL	1 μL	0.5 μL

3. (以 24 孔板为例) 吸取 200 μL 预混裂解液于每孔中, 反复吹打 5-10 次, 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 200 μL 以下。细胞裂解后可能略显混浊, 属于正常现象。

4. (以 24 孔板为例) 在上述液体中加入 20 μL Buffer ST(不同裂解体系 Buffer ST 加入量见表 1-3), 反复吹打 5-10 次, 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 200 μL 以下。

表 1-3: Buffer ST 加入量

Buffer ST	6 孔板	12 孔板	24 孔板	96 孔板	384 孔板
	100 μL/孔	40 μL/孔	20 μL/孔	5 μL/孔	2.5 μL/孔

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, 请置于冰上不能超过 2 hr, -20°C或-80°C保存(不超过三个月)。

B. RT 体系配制

1. 取出 5× RT Easy™ Mix 置于冰浴上, 使其自然融化, 并轻揉混匀待用; 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	8 μL	1x
裂解产物(RNA模板)	4 μL	8 μL	添加范围调整 (10-40%)
RNase-Free ddH ₂ O	12 μL	24 μL	

Total Volume	20 μ L	40 μ L	
--------------	------------	------------	--

2. 体系配制完成后, 轻柔混匀并简短离心后按照下表 3-2 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	15-30 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. 反应完成之后, 反应产物置于冰上直接用于 Real Time PCR, 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。得到的 RT 反应液加入到下一步的 Real Time PCR 反应体系中, 建议添加范围为反应体系的 10-30%量。

C. qPCR 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 PCR 检测时, 模板量占 PCR 体系的 10-30%。如 20 μ L 的 PCR 体系中, 加入 2-6 μ L 裂解液即可, 但不能超过 6 μ L。

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 3-1: PCR 反应体系配制

PCR 体系添加内容	用 量	终 浓 度
2x Direct qPCR Mix-Taqman	10 μ L	1x
Forward Primer (10 μ M)	0.4 μ L	50-900 nM 1*
Reverse Primer (10 μ M)	0.4 μ L	50-900 nM 1*
Probe(10 μ M)	0.2 μ L	100 nM
cDNA模板(B步骤所得)	4 μ L	10-30%
RNase-Free ddH ₂ O	—	
20xROX Reference Dye 3*	—	—
Total Volume	20 μ L	

1*: 引物反应性能较差时, 可以在 50-900nM 范围内调整引物浓度。

注意: qPCR 体系可以根据实验需要和 PCR 型号进行调节。50 μ L 体系的 qPCR, 请参照 20 μ L

体系按比例调整试剂用量。

2*: 根据定量 PCR 仪器不同选择合适终浓度的 ROX Reference Dye。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 μ L体系, 加入 1 μ L 20x ROX Reference Dye)
ABI 7500/7500 Fast和Stratagene Mx3000P/Mx3005P/Mx4000等	0.5x(如 20 μ L 体系, 加入 0.5 μ L 20x ROX Reference Dye)

表 3-2: qPCR 反应条件设置

步骤 (两步法)	温度	时间	循环数	内容
1	95°C	3 min	1	预变性
2	95°C	5-10 sec	40	循环中模板变性
3	60-65°C	20-30 sec		退火/延伸

注意: 为了得到最佳的 qPCR 效果, 针对不同的模板、不同的引物可采用梯度 PCR 优化反应条件。PCR 反应条件视定量 PCR 仪、模板、引物等的不同而各异。在具体操作中需要根据定量 PCR 仪、模板类型、目的片段大小、扩增片段的碱基序列和引物的 GC 含量及长短等具体情况来设计最佳的反应条件, 包括退火温度, 反应时间等。

Real Time PCR 引物设计原则

Forward Primer和Reverse Primer

进行Real Time PCR，引物设计非常重要。引物关系到PCR扩增的特异性、高效性等，可以参照以下原则进行引物设计：

- ◆ 引物长度：18-30bp。
- ◆ GC含量：40-60%。
- ◆ Tm值：引物设计软件，如Primer 5，可以给出引物的Tm值。上下游引物的Tm值应尽量接近。也可以使用Tm计算公式： $Tm=4^{\circ}\text{C}(\text{G}+\text{C})+2^{\circ}\text{C}(\text{A}+\text{T})$ 。进行PCR时，一般选择低于引物Tm值5°C的温度作为退火温度(相应的提高退火温度可以增加PCR反应的特异性)。
- ◆ 引物及PCR产物：
 - ❖ 设计引物PCR扩增产物长度最好在100-150bp。
 - ❖ 应尽量避免在模板的二级结构区域设计引物。
 - ❖ 避免上下游引物3'端之间形成2个或2个以上的互补碱基。
 - ❖ 引物3'端碱基不能存在多余3个连续的G或C。
 - ❖ 引物自身不能存在互补结构，否则会形成发夹结构，影响PCR扩增。
 - ❖ 引物序列中ATCG应尽量分布均匀，3'端碱基避免为T。

Probe

探针选择要保守，引物选择要保守，因此必须找一段100-200bp相对要保守的片段来设计引物与探针。即real-time PCR的扩增片段是50bp-150bp。当找不到150bp的保守片段时，必须确保探针的片段是保守的。一般按照以下原则进行Probe的设计：

- ◆ 探针位置尽可能地靠近上游引物。
- ◆ 探针长度应在15-45bp(最好是20-30bp)，以保证结合特异性。
- ◆ 检测探针的DNA折叠和二级结构。
- ◆ Tm值在65-70°C，通常比引物TM值高5-10°C(至少要5°C)，GC含量在40%-70%。
- ◆ 探针的5'端应避免使用G鸟嘌呤——因为5'G会有淬灭作用，而且即使是被切割下来还会存在淬灭作用。
- ◆ 整条探针中，碱基C的含量要明显高于G的含量——G含量高会降低反应效率，这

时就应选择配对的另一条链作为探针。

- ◆ 为确保引物探针的特异性，最好将设计好的序列在blast中核实一次，如果发现非特异性互补区，建议重新设计引物探针。

附表 1：细胞直接 RT-qPCR 试剂盒组分补充包

1. Cell Lysate

Cell Lysate(细胞裂解液)			
试剂盒组成 (24-well lysis system / well)		DRT-01011-A1	DRT-01011-A2
		100 T	500 T
Part I	Buffer CL	20 mL	100 mL
	Foregene Protease Plus II	400 μ L	1 mL \times 2
	Buffer ST	1 mL \times 2	10 mL
Part II	DNA Eraser	400 μ L	1 mL \times 2

2. RT Mix

RT Mix(RT 反应液)	
试剂盒组成 (20 μ L reaction system)	DRT-01011-B1
	200 T
5x Direct RT Mix	800 μ L
RNase-Free ddH ₂ O	1.7 mL \times 2

3. qPCR Mix

qPCR Mix(qPCR 反应液)		
试剂盒组成 (20 μ L reaction system)	DRT-01021-C1	DRT-01021-C2
	200 T	1000 T
2x Direct qPCR Mix-Taqman	1 mL \times 2	1.7 mL \times 6
20x ROX Reference Dye	40 μ L	200 μ L
RNase-Free ddH ₂ O	1.7 mL	10 mL

中国 ● 福际

World's Foregene

成都福际生物技术有限公司

电话: 028-83360257, 028-83361257

E-mail: info@foregene.com

Http://www.foregene.com

