

Version 1

Code No. CM0299

AdeptTect 细胞 RT-qPCR 试剂盒（探针法）

AdeptTect Cell Direct RT-qPCR Kit (Probe)

本产品仅供科学研究使用，不能用于人、动物的医疗或诊断程序，不能使用本产品作为食品、化妆品或家庭用品等。

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures for humans or animals. Also, do not use this product as food, cosmetic, or household item, etc.



➤ 产品概述

本产品是一款可直接对细胞进行裂解、反转与探针法定量检测的试剂盒。本产品无需繁琐的 RNA 提取流程，使用试剂盒中独特的裂解缓冲液可直接从细胞培养板（兼容 96/384 孔板高通量实验）中完成细胞裂解并释放 RNA，同时有效去除基因组 DNA，裂解完成后可搭配试剂盒中 2.5X *Evo Super M-MLV* Plus cDNA Synthesis Mix 与 2X Probe Premix (UNG Plus) 进行 RT-qPCR 扩增，整个过程仅需 2 h 即可从细胞中获得基因表达结果。

本产品适用于 $10 \sim 10^5$ 个培养的各种动物细胞（包括贴壁细胞、悬浮细胞、原代细胞及干细胞等多种细胞类型）的基因表达分析。本产品具有抗干扰性能强、反转效率高、反应速度快、灵敏度高与特异性好等特点。同时 2X Probe Premix (UNG Plus) 中引入 dUTP/UNG 防污染系统，可有效防止假阳性结果的产生，提升基因表达分析的准确性。

➤ 产品组成

组分名称	CM0299 (50 rxns)
1.04X Cell Lysis Buffer	1.2 ml X 2 pcs
gDNA Clean Reagent ^{*1}	100 μ l
Stop Solution	250 μ l
2.5X <i>Evo Super M-MLV</i> Plus cDNA Synthesis Mix ^{*2}	400 μ l
2X Probe Premix (UNG Plus) ^{*3}	1.25 ml X 2 pcs
RNase free water	1 ml X 2 pcs

*1: 含有 gDNA Enzyme 等。

*2: 含有 *Evo Super M-MLV*、RNase Inhibitor、Oligo dT (18T) Primer 与 Random 6 mers Primer 等。

*3: 含有 *Accurate Super Taq* HS DNA Polymerase、UNG Enzyme 等。

➤ 保存及运输

保存温度：-20℃保存（1.04X Cell Lysis Buffer 与 Stop Solution 在使用后可 4℃保存）

运输温度：干冰运输或者-20℃冰袋运输

➤ 实验前准备

1. **试剂 & 耗材**：引物、探针引物、水（RNase-free）、1.5 ml 离心管（RNase-free）、PCR 管（RNase-free）、枪头（RNase-free）。

2. **仪器：**PCR 仪、定量 PCR 仪、移液器、涡旋振荡仪、小型桌面离心机。

➤ 使用注意事项

1. 使用本产品时需要注意防止 RNase 污染，需要使用无菌无酶的器具，操作过程中要避免说话，且需要穿实验服，戴一次性手套、口罩等防止 RNA 被污染或降解。
2. 为避免样品交叉污染，建议使用带滤芯的枪头，吸取不同样本时请更换枪头。
3. 本产品中配有的细胞裂解液不能有效裂解细胞壁。若是样本为带有细胞壁的细胞，如植物细胞、真菌等，建议先去除细胞壁或使用提取后的 RNA 为模板。哺乳动物细胞可直接使用本产品中的裂解液进行裂解。
4. 细胞样本收集后，建议确认细胞活力，死细胞会发生明显的 RNA 降解，导致实验失败。细胞培养基对实验有抑制作用，建议实验前用不含 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 等的 1X PBS 洗涤细胞，反应体系中培养基等液体加入体积越少越好。
5. 本产品中未配有 ROX Reference Dye，如果反应中需要添加 ROX Reference Dye 用以校正孔间荧光信号值误差，可选择如下产品配合使用：（请根据仪器设备说明书要求确定是否需要添加 ROX Reference Dye）

ROX Reference Dye (20 μ M) (AG11703)

ROX Reference Dye (4 μ M) (AG11710)

注：上述 ROX Reference Dye 产品建议 50X 稀释后使用（例如，50 μ l 反应体系中添加 1 μ l ROX Reference Dye），若实验结果不理想，可调整 ROX Reference Dye 添加量。

6. 本产品中 gDNA Clean Reagent、2.5X *Evo Super M-MLV* Plus cDNA Synthesis Mix 与 2X Probe Premix (UNG Plus) 需避免反复冻融，防止酶活降低；使用前用移液器轻柔吸打混匀，请勿涡旋振荡混匀，防止酶活降低，同时避免产生过多气泡导致反应液配制时体积产生误差。
7. 2X Probe Premix (UNG Plus) 在 -20°C 存放时可能会产生白色沉淀，属于正常现象，使用前可放冰上溶解，充分颠倒混匀至沉淀全部消失。

➤ 操作方法

一、样本处理与准备

◆ 贴壁细胞处理（以 96 孔板培养的细胞为例）：

将不同孔板的贴壁细胞用移液器轻柔并充分吸除培养基，贴壁缓慢加入 125 μ l 预冷的 PBS 缓冲液清洗细胞，缓慢去除 PBS 缓冲液后，置于冰上备用。

◆ 悬浮细胞处理：

- a) 对细胞进行计数，将一定量的细胞转移至适当大小的离心管中，1000 rpm (注：不同细胞的离心条件不同，请使用合适于所用细胞的离心速度进行离心) 4°C离心 5 min 收集细胞至管底，用移液器轻柔并充分吸除培养基。
- b) 贴壁缓慢加入合适体积预冷的 PBS 缓冲液清洗细胞，1000 rpm 4°C离心 5 min 收集细胞至管底，缓慢去除 PBS 缓冲液后，加入合适体积的、新的 PBS 缓冲液对细胞进行重悬，并计算细胞浓度。
- c) 根据实验需求，用预冷的 PBS 缓冲液对细胞重悬液进行稀释，并分装至八联排中，分装体积不超过 5 μl/孔(保持细胞数在 10 ~ 10⁵ 个/管)，置于冰上备用。

二、细胞裂解，获取 RNA

1. 配制细胞裂解液：

根据实验需求按比例在冰上配制裂解体系^{*1}：

组分名称	试剂用量 ^{*2}
1.04X Cell Lysis Buffer	48 μl
gDNA Clean Reagent	2 μl
Total	50 μl

*1: 裂解体系需现配现用，配制完成后颠倒混匀 10 ~ 15 次，避免剧烈涡旋振荡，混匀后置于冰上，请在 1 h 内使用。

*2: 裂解液需根据实验需求按比例进行配制，各组分的配制比例为 1.04X Cell Lysis Buffer : gDNA Clean Reagent = 24 : 1。

2. 细胞裂解与终止反应：

◆ 贴壁细胞：

- a) 细胞裂解：按照下表加入合适体积的裂解液，用移液器轻轻吸打混匀 8 ~ 10 次，室温 (20 ~ 30°C) 孵育 5 min。

组分名称	体积					
细胞板	384 孔	96 孔	48 孔	24 孔	12 孔	6 孔
细胞裂解液体积	25 μl	50 μl	100 μl	150 μl	250 μl	750 μl

- b) 终止反应：孵育完成后，按照下表在每个反应孔中加入合适体积的 Stop Solution，用移液器轻轻吸打混匀 8 ~ 10 次，室温 (20 ~ 30°C) 孵育 2 min，孵育完成后放置于冰上。

组分名称	体积					
细胞板	384 孔	96 孔	48 孔	24 孔	12 孔	6 孔
Stop Solution	2.5 μl	5 μl	10 μl	15 μl	25 μl	75 μl

- ✚ 注：细胞裂解完成，其产物可用于后续的 RT-qPCR 实验，若无法及时进行后续实验，可于冰上暂存 (不超过 2 h)，长期保存需置于 -80°C。

◆ **悬浮细胞:**

- a) 细胞裂解: 按照下表根据细胞数在每个反应孔中加入合适体积的裂解液, 用移液器轻轻吸打混匀 8 ~ 10 次, 室温 (20 ~ 30°C) 孵育 5 min。

组分名称	体积	
细胞数	10 ~ 10 ³	10 ³ ~ 10 ⁵
细胞裂解液体积	25 μl	50 μl ³

- b) 终止反应: 孵育完成后, 按照下表在每个反应孔中加入合适体积的 Stop Solution, 用移液器轻轻吸打混匀 8 ~ 10 次, 室温 (20 ~ 30°C) 孵育 2 min, 孵育完成后放置于冰上。

组分名称	体积	
细胞板	1 ~ 10 ³	10 ~ 10 ⁵
Stop Solution	2.5 μl	5 μl ³

*3: 当裂解细胞数量较高时, 高拷贝基因可能会出现高模板抑制, 可将细胞裂解液体积提高至 200 μl, 同时将 Stop Solution 添加体积提高至 20 μl。

- ✚ 注: 细胞裂解完成, 其产物可用于后续的 RT-qPCR 实验, 若无法及时进行后续实验, 可于冰上暂存 (不超过 2 h), 长期保存需置于 -80°C。

三、第一链 cDNA 合成

1. 按照下表内容配制反转反应液:

组分名称	加入量
2.5X <i>Evo Super M-MLV</i> Plus cDNA Synthesis Mix	8 μl
细胞裂解产物	2 μl ¹
RNase free water	up to 20 μl

*1: 细胞裂解产物推荐添加量为 2 μl, 可根据需求在 1 ~ 8 μl 范围内调整加入量。

2. 合成 cDNA 反应条件:

30°C	5 min ¹
50°C ²	15 min ³
85°C	2 min ⁴
4°C	-

*1: 30°C, 5 min 处理, 可使 Random 引物与模板充分退火增加反转录效率, 也可根据实验需求在 0 ~ 5 min 范围内调整。

*2: *Evo Super M-MLV* Plus 对于含有复杂二级结构的模板同样具有良好的延伸性能, 反转温度通常设置为 50°C 即可获得理想结果, 也可以根据实际需求将温度在 42°C ~ 60°C 范围内进行调整。

*3: 一般情况下反转时间 15 min 均能获得较好结果, 反转时间可根据需求在 5 min ~ 15 min 内调整。

*4: 85°C, 2 min 可以让反转酶失活。

3. 上述得到的 cDNA 溶液可置于冰上, 直接用于后续 qPCR 扩增, 长期保存建议放于 -20°C 或 -80°C。

四、Real Time PCR 扩增

1. 按照下表内容配制 qPCR 反应液:

(以 ABI QuantStudio™ 5 Real-Time PCR Systems 为例)

组分名称	加入量
2X Probe Premix (UNG Plus)	10 μ l
cDNA 模板	4 μ l ^{*1}
Primer F (10 μ M)	0.8 μ l ^{*2}
Primer R (10 μ M)	0.8 μ l ^{*2}
Probe (10 μ M)	0.4 μ l ^{*3}
ROX Reference Dye (4 μ M)	0.4 μ l ^{*4}
RNase free water	up to 20 μ l

*1: 在 20 μ l 体系中, cDNA 模板推荐添加量为 4 μ l, 可根据实际需求在 2 ~ 8 μ l 的范围内进行调整。

*2: 引物推荐使用终浓度为 0.4 μ M, 也可以在 0.1 ~ 1.0 μ M 范围内调整。

*3: 探针浓度与使用的定量 PCR 仪、荧光标记物质种类有关, 请参照仪器说明书及荧光探针的具体使用要求调整。探针推荐使用终浓度为 0.2 μ M, 可根据实际需求在 0.1 ~ 0.8 μ M 范围内进行调整。

*4: 请按照不同仪器推荐的反应体系配制反应液。如果需要使用 ROX 进行荧光信号校准, 请按照仪器推荐量添加(不同仪器推荐 ROX 添加量可参考附录一)。若不需要使用 ROX 的定量 PCR 仪, ROX Reference Dye 可用 RNase free water 代替。

2. 两步法 PCR 反应程序^{*1}:

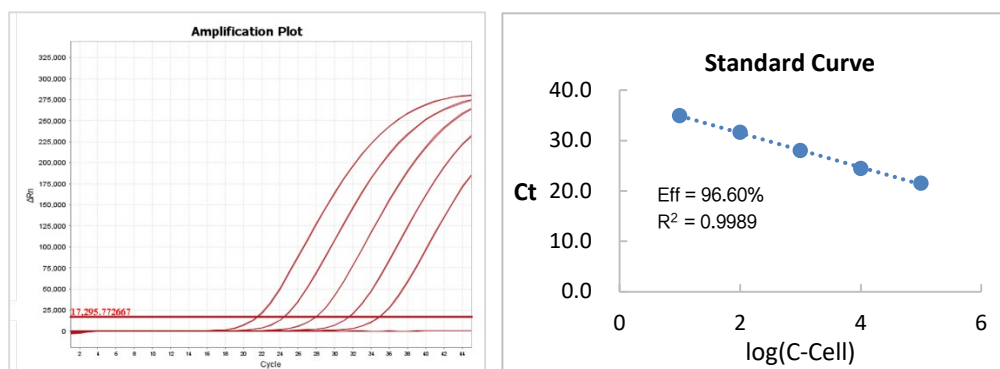
步骤	温度	时间	循环数
UNG 处理	25°C	0 ~ 5 min ^{*2}	1
预变性	95°C	30 sec ^{*3}	1
变性	95°C	5 sec	} 40
退火和延伸 ^{*5}	60°C	30 sec ^{*4}	

*1: 建议首先采用两步法 PCR 反应程序, 如果得不到良好的实验结果时再优化反应条件; 如果引物 T_m 值较低, 导致两步法扩增效率较差, 可采用三步法进行 PCR 扩增(三步法 PCR 反应程序可参考附录二)。

- *2: 建议在 25°C, 5 min 条件下进行 UNG 处理, 能够充分降解含 dU 的污染模板; 可根据实际情况在 0 ~ 5 min 内调整。
- *3: 预变性时间通常设定为 30 sec, 如果模板变性困难, 可以延长预变性时间至 1 ~ 2min。
- *4: 通常情况下 PCR 扩增产物设计在 300 bp 以下, 扩增延伸反应条件设定为 60°C, 30 sec 时可以满足要求; 如需提高反应特异性, 可适当提高退火温度; 如需提高扩增效率, 或者 PCR 扩增产物较长, 则可将退火和延伸时间适当延长, 同时也可尝试进行三步法 PCR 扩增。
- *5: 此步骤进行荧光信号采集。

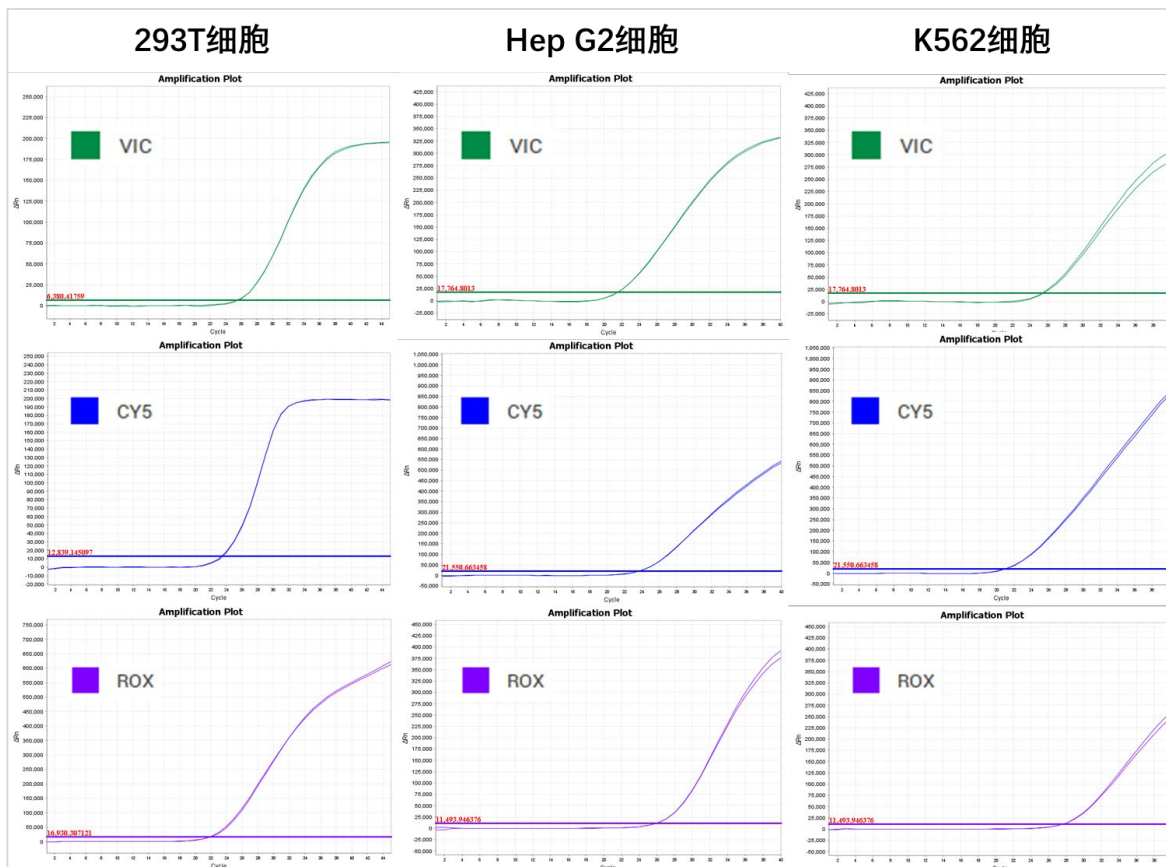
➤ 实验例

1. 以 293T 细胞 (10 ~ 100,000 个细胞) 为模板, 用 50 μl 的裂解液对其进行裂解, 裂解后进行反转录与定量反应。实验结果如下:



结果如上图所示:

- 1、不同浓度的模板在 45 cycles 以内均能获得良好的扩增。
 - 2、阴性对照在 45 cycles 没有检出。
 - 3、扩增效率为 96.6%, R²=0.9989。
2. 分别以 293T 细胞、Hep G2 细胞与 K562 细胞为模板 (10,000 个细胞), 使用本产品进行裂解、反转与三重定量检测。实验结果如下:



结果如上图所示：

- 1、该产品对不同类型细胞均能进行很好的扩增。
- 2、该产品可以进行多重检测。

➤ 产品注意事项

1. 不同细胞数需使用合适体积的裂解液进行裂解，并在进行 RT 与 qPCR 反应时添加合适体积的产物作为模板。
 - ❖ 当投入细胞数较低，或基因表达量较低时，建议按照 25 μ l 的细胞裂解液进行裂解，并在推荐范围内提高裂解产物添加量，以提高扩增体系中模板的浓度。
 - ❖ 当投入细胞数较高，或基因表达量较高时，建议按照 200 μ l 的细胞裂解液进行裂解，并在推荐范围内降低裂解产物添加量，以避免过量的细胞内容物或模板抑制扩增反应。
2. 建议使用新鲜培养的细胞，冻存过程中可能会导致 RNA 降解而无扩增产物或产量较低。如使用了冻存细胞，避免使用 PBS 漂洗，PBS 漂洗后会大量损失 RNA，可能导致无扩增产物或产量较低。
3. 需控制好细胞裂解时间，细胞裂解时间过短会导致基因组 DNA 无法完全消除，影响后续实验结果；当室温较低时，可适当延长裂解时间，但不宜超过 10 min。
4. 细胞裂解产物可在冰上保存 2 h，长时间保存需放置于 -80°C ，在室温放置时间过久会导致 RNA 降解，影响后续扩增结果。

➤ 附录一：不同仪器推荐 ROX 添加量

	仪器
无需添加 ROX	(Bio-Rad) IQ 5, CFX 96™, CFX 384™, CFX Connect™, MJ Opticon, Opticon 2; (Cepheid) SmartCycler® System, Smart Cycler II System; (Roche) LightCycler® 2.0, 480, 96; (Qiagen) Rotor-Gene® Q, 3000, 6000; (Bioer) Line-Gene; (Eppendorf) Mastercycler ep realplex; (Analytik Jena) qTOWER3.
添加 ROX (终浓度为 0.4 μ M)	(Thermo) ABI 7000, 7300, 7700, 7900, 7900 HT, 7900 HT Fast, StepOne, StepOnePlus.
添加 ROX (终浓度为 0.08 μ M)	(Thermo) ABI 7500, 7500 Fast, ViiA™ 7, QuantStudio™ 3 / 5, QuantStudio™ 6 / 7 / 12K Flex, QuantStudio™ Dx; (Agilent) Mx3000P™, Mx3005P™, MX4000™.

➤ 附录二：三步法 PCR 反应程序

步骤	温度	时间	循环数
UNG 处理	25°C	0 ~ 5 min	1
预变性	95°C	30 sec	1
变性	95°C	5 sec	} 40
退火	55°C	30 sec	
延伸 ^{*1}	72°C	30 sec	

*1: 此步骤进行荧光信号采集。