

Version 1

Code No. CM0300

AdeptTect 细胞一步法 RT-qPCR 试剂盒（探针法）

AdeptTect Cell Direct One Step 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 One Step RT-qPCR Probe Mixture (UNG Plus) 进行 RT-qPCR 扩增，整个过程仅需 1.5 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 2.5X One Step RT-qPCR Probe Mixture (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	CM0300 (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 One Step RT-qPCR Probe Mixture (UNG Plus) ^{*2}	1 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* RTase Enzyme、RNase Inhibitor、*Accurate Taq* HS DNA Polymerase、UNG Enzyme、dN(U)TP Mixture 及反应 Buffer 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

- 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）。
- 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 与 2.5X One Step RT-qPCR Probe Mixture (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. 2.5X One Step RT-qPCR Probe Mixture (UNG Plus) 可能会产生淡黄色或白色沉淀，使用前可于冰上溶解或室温溶解，轻柔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，请使用合适用于所用细胞的离心速度进行离心）4℃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 μ l/孔(保持细胞数在 $10 \sim 10^5$ 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 μ l
gDNA Clean Reagent	2 μ l
Total	50 μ l

*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 μ l	50 μ l	100 μ l	150 μ l	250 μ l	750 μ l

- 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 μ l	5 μ l	10 μ l	15 μ l	25 μ l	75 μ l

- ✚ 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、One Step RT-qPCR 扩增

1. 按照下表内容配制 RT-qPCR 反应液：

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

组分名称	加入量
2.5X One Step RT-qPCR Probe Mixture (UNG Plus)	8 μl
细胞裂解产物	2 μl ¹
Primer F (10 μM)	0.8 μl ²
Primer R (10 μM)	0.8 μl ²
Probe (10 μM)	0.4 μl ³
ROX Reference Dye (4 μM)	0.4 μl ⁴
RNase free water	up to 20 μl

*1: 在 20 μl 体系中，细胞裂解产物的推荐添加量为 2 μl，可根据实际需求在 1 ~ 6 μl 的范围内进行调整。

*2: 引物推荐使用终浓度为 0.4 μM，可根据实际需求在 0.1 ~ 1.0 μM 范围内进行调整。

*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 μM，可根据实际需求在 0.1 ~ 0.5 μM 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
反转	50°C	15 min ^{*3}	1
预变性	95°C	30 sec ^{*4}	1
变性	95°C	5 sec	} 40
退火和延伸 ^{*6}	60°C	30 sec ^{*5}	

*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 Tm 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: 建议在 50°C, 15 min 条件下进行反转, 反转温度可在 42°C ~ 60°C 范围内进行调整, 反转时间可在 5 min ~ 15 min 内进行调整。

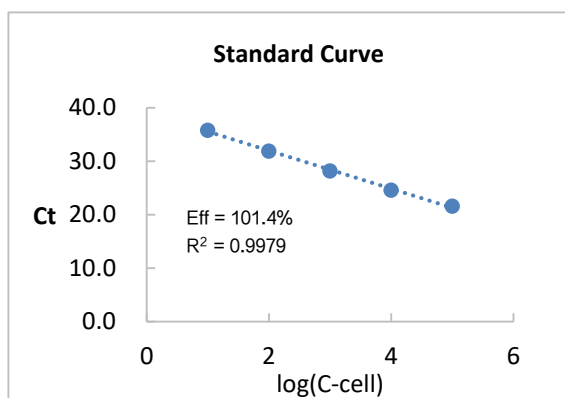
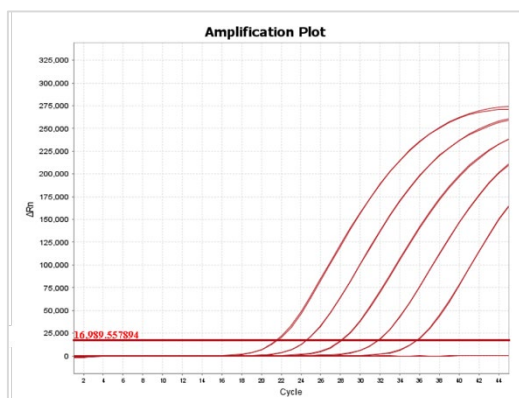
*4: 预变性时间通常设定为 30 sec, 如果模板变性困难, 可以延长预变性时间至 1 ~ 2min。

*5: 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。

*6: 此步骤进行荧光信号采集。

➤ 实验例

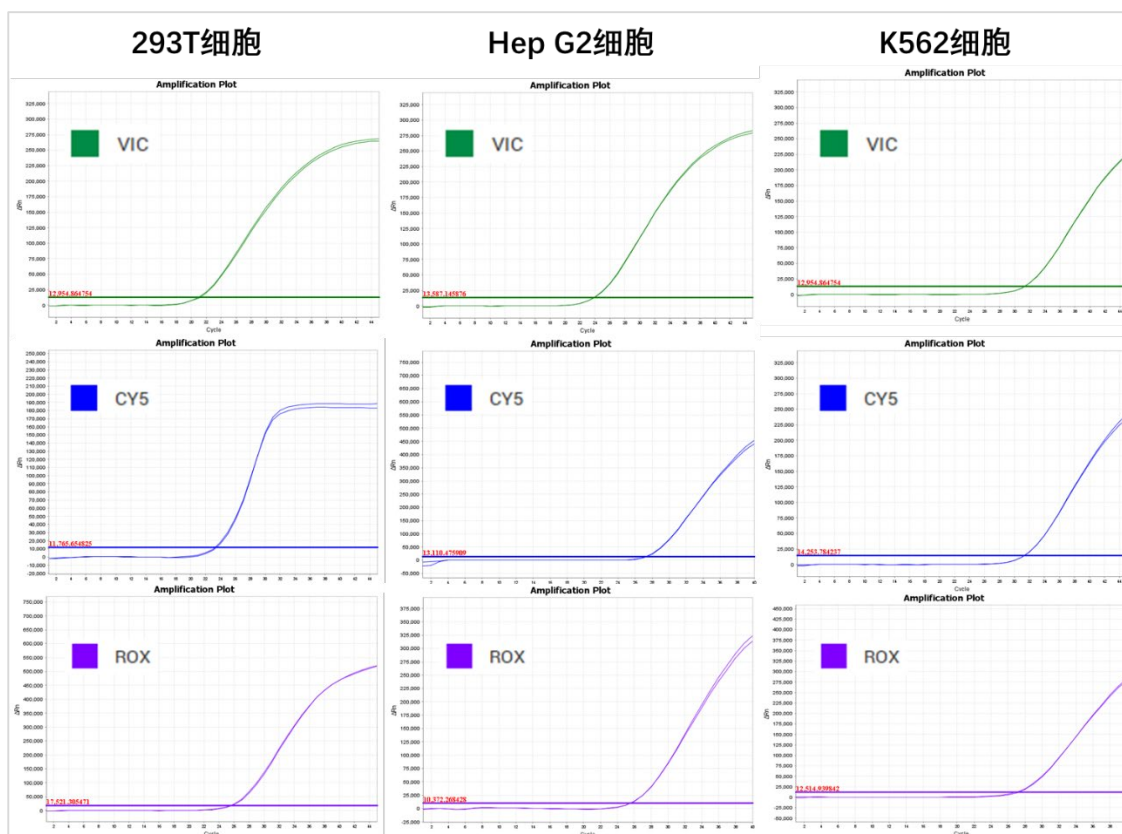
1. 以 293T 细胞 (10 ~ 100,000 个细胞) 为模板, 用 50 μl 的裂解液对其进行裂解, 裂解后进行 One step RT-qPCR 反应。实验结果如下:



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 101.4%， $R^2=0.9979$ 。

2. 分别以 293T 细胞、Hep G2 细胞与 K562 细胞为模板（10,000 个细胞），使用本试剂盒对其进行 One step RT-qPCR 三重扩增。实验结果如下：



结果如上图所示：

- 1、该产品对不同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，并在进行一步法 RT-qPCR 反应时添加合适体积的裂解产物作为模板。
 - ❖ 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 μM)	(Thermo) ABI 7000, 7300, 7700, 7900, 7900 HT, 7900 HT Fast, StepOne, StepOnePlus.
添加 ROX (终浓度为 0.08 μM)	(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。