

For research use only

Version Number: 1.0

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

(One Step)-Taqman

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

试剂盒组成		DRT-02123	备注
50 μL 裂解体系 / 20 μL RT-qPCR 反应体系		96 T	
Part I	Buffer CL (One Step)	5.1 mL	Cell Lysis
	Foregene Protease Plus III (One Step)	110 μL	
	Buffer ST (One Step)	530 μL	
Part II	DNA Eraser (One Step)	110 μL	RT-qPCR
	2× Direct RT-qPCR Mix (One Step)	1.1 mL	
	20× ROX Reference Dye	110 μL	
	RNase-Free ddH ₂ O	1.7 mL	
说明书		1 份	

裂解部分试剂 DNA Eraser 在试剂盒 Part II。

产品简介

本产品采用独特的裂解缓冲体系可以快速地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, 仅需 7 min 即可得到所需要的 RNA 模板, 配合试剂盒提供的 2× Direct RT-qPCR Mix (One Step) 能够快速得到有效的实时定量 PCR 结果。

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 保存于 2-8℃; Part II 保存于-20±5℃。

试剂盒组分信息

- ❖ Buffer CL (One Step): 提供细胞裂解反应所需环境。
- ❖ Foregene Protease Plus III (One Step): 在裂解缓冲液的环境下，裂解细胞，释放核酸。
- ❖ DNA Eraser (One Step): DNA 去除剂，去除基因组对后续实验的影响。
- ❖ Buffer ST (One Step): 终止裂解液中的活性物质，避免对后续 RT 造成影响。
- ❖ 2× Direct RT-qPCR Mix (One Step): 包含福际生物专门研制的高 RNA 亲和性 Foreasy Reverse Transcriptase, Foreasy HS Taq DNA Polymerase 以及 RNase Inhibitor、dNTPs、稳定剂、增强剂、优化剂。

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。
- ◆ 2× Direct RT-qPCR Mix (One Step)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 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 PBS，切勿吹打，从孔中吸除 PBS。吸除 PBS 时培养板倾斜，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：1000 ×g 离心 10 min，去除上清，收集细胞沉淀；加入 50 μL PBS 清洗，1000 ×g 离心 10 min，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，请使用适用于所用细胞的离心速度进行离心。
2. 细胞裂解：取出 Buffer CL (One Step) ，使其温度平衡至室温，加入 DNA Eraser (One Step) 和 Foregene Protease Plus III (One Step) ，按照表 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**
- | 细胞裂解预混液
50 μL/孔 | 1 孔试剂用量 |
|---------------------------------------|---------|
| Buffer CL (One Step) | 48 μL |
| DNA Eraser (One Step) | 1 μL |
| Foregene Protease Plus III (One Step) | 1 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℃) 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，可借助显微镜观察细胞是否裂解充分。
4. 向上述液体中加入 5 μL Buffer ST (One Step) ，反复吹打 5-10 次或者平板混匀仪器混匀数秒，室温(20-25℃) 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. 裂解产物立即用于后续的 RT-qPCR 实验,若无法及时进行后续实验,请置于冰上(不能超过 1 h),也可置于-80℃保存（不超过一个月）。

B: RT-qPCR 反应体系配制与反应程序设置

1. 取适量 A 步骤制备的裂解产物作为模板按照表 2 制备反应体系。
- 注意：用于后续 RT-qPCR 检测时，模板量占 RT-qPCR 体系的 10%-30%。如 20 μL 的 RT-qPCR 体系中，加入 2-6 μL 模版即可，不能超过 6 μL。

表 2：RT-qPCR 反应体系配制

RT-qPCR 体系添加内容	用 量	终浓度
2× Direct RT-qPCR Mix (One Step)	10 μL	1×
Forward Primer (10 μM)	0.8 μL	50-900 nM
Reverse Primer (10 μM)	0.8 μL	50-900 nM
Probe (10 μM)	0.4 μL	200 nM
裂解产物 (A 步骤所得)	3 μL	10%-30%
RNase-Free ddH ₂ O	5 μL	
20×ROX Reference Dye *	-	-
Total Volume	20 μL	

*：根据不同定量 PCR 仪器选择合适的 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. 根据优化好的 RT-qPCR 条件（退火温度等）进行 RT-qPCR 反应，条件见表 3。

注意：尽量使用优化后的条件进行 RT-qPCR 反应，可以得到更好的结果。

表 3：RT-qPCR 反应条件设置

步 骤	温 度	时 间	循环数	内 容
1	50℃	15 min	1	逆转录
2	95℃	3 min	1	预变性
3	95℃	10 sec	40	循环中模板变性
4	60-65℃（采集荧光信号）	30 sec		退火/延伸