

Quick-Direct Cell RT-qPCR Kit (96-well)

细胞快速直扩 RT-qPCR 试剂盒(96 孔)

目录号

DLQ105

产品简介

本产品是一款专为动物细胞高通量基因表达分析设计的直扩定量试剂盒，适用于 96 孔板细胞培养体系。该试剂盒突破了传统 RT-qPCR 实验流程，无需 RNA 提取步骤，直接从细胞裂解产物中完成逆转录和 qPCR 扩增，将实验时间从数小时缩短至 1.5-2 小时，显著提升实验效率，同时保持高灵敏度和特异性。

产品组成

组分		规格	备注
Part I	Buffer CL	5 mL	Cell Lysis
	Protease Plus II	100 μ L	
	Buffer ST	500 μ L	
Part II	DNA Eraser	100 μ L	RT
	5 $\times$ Direct RT Mix	400 μ L	
	2 $\times$ Direct qPCR Mix-SYBR	1 mL $\times$ 2	qPCR
	50 $\times$ ROX Reference Dye	400 μ L	
	RNase-Free ddH ₂ O	1.7 mL	

产品应用

- ◆ 本产品适用于动物细胞直扩 RT-qPCR 定量。

产品特点

- ◆ 操作简单：7 min 完成细胞裂解，释放 RNA；
- ◆ 抗干扰强：内含高效 DNase I 酶，消除基因组污染；
- ◆ 灵敏度高、特异性强。

使用方法

A. 样本 RNA 释放

- 细胞预处理：用预冷的 PBS 洗涤细胞培养板，并进行细胞的裂解。
 - 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 μ L 预冷的 1 $\times$ PBS，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。
- 悬浮细胞：进行细胞数量计数后，1000 $\times$ g 离心 10 min，去除上清，收集细胞沉淀；加入 50 μ L 预冷的 PBS 清洗，1000 $\times$ 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：确保细胞贴壁牢固，避免洗涤时出现大量细胞丢失。

注意：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。

- 细胞裂解：取出 Buffer CL，使其温度平衡至室温，加入 DNA Eraser 和 Protease Plus II，按照下表制备裂解体系：（裂解液新鲜配制，即配即用）。
- Buffer CL 平衡后，加入 DNA Eraser 和 Protease Plus II，按照下表制备裂解体系配制：



组分（细胞裂解预混液）50 μL/孔	1 孔试剂用量	96 孔试剂用量
Buffer CL	48 μL	4608 μL
DNA Eraser	1 μL	96 μL
Protease Plus II	1 μL	96 μL

注意：裂解液新鲜配制，即配即用，配制时请于冰上操作。

- 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。

- 在上述液体中加入 5 μL Buffer ST，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。

- 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，请置于冰浴上（不能超过 2 h），也可于 -20℃ 或 -80℃ 保存（不超过三个月）。

B：RT 体系配制

- 取出 5×Direct RT Mix、RNase-Free ddH₂O 置于冰浴上，使其自然融化，并轻柔混匀待用。
- 在无核酸酶的微量离心管中按照下表在冰上配制反应体系（20 μL）：

RT 体系添加内容	用 量	终浓度
5×Direct RT Mix	4 μL	1×
细胞裂解产物(RNA 模板)	4 μL	添加范围调整(10-40%)
RNase-Free ddH ₂ O	12 μL	
Total Volume	20 μL	

- 体系配制完成后，轻柔混匀并简短离心后按照下表的反应条件进行 RT 反应：

阶段	温 度	时 间
cDNA 合成	42℃	20min
逆转录酶失活	95℃	5min
保存	4℃	∞

- 反应完成后，反应产物置于冰上直接用于 qPCR，长期保存请置于 -20℃ 或 -80℃。

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。

C：qPCR 反应体系配制

- 取适量的 B 步骤制备的 cDNA 模板按照下表制备反应体系。

注意：用于后续 qPCR 检测时，模板量占 qPCR 体系的 10-30%。如 20 μL 的 qPCR 体系中，加入 2-6 μL 模板即可，但不能超过 6 μL。

- 无核酸酶的微量离心管中按照下表配置 qPCR 反应体系：

qPCR 体系添加内容	用 量	终浓度
2×Direct qPCR Mix-SYBR	10 μL	1×
Forward Primer (10 μM)	0.5 μL	50-900 nM
Reverse Primer (10 μM)	0.5 μL	50-900 nM
cDNA 模板(B 步骤所得)	4 μL	10-30%
RNase-Free ddH ₂ O	5 μL	
50×ROX Reference Dye*	-	-
Total Volume	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	5×(如 20 μL 体系, 加入 2 μL 50× ROX Reference Dye)
ABI 7500/7500 Fast 和 Stratagene Mx3000P/Mx3005P/Mx4000 等	1×(如 20 μL 体系, 加入 0.4 μL 50× ROX Reference Dye)

3. 根据优化好的 qPCR 条件 (退火温度等) 进行 qPCR 反应 (反应条件见步骤 4/5)。

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。

4. 两步法 qPCR 按下方程序进行反应:

阶段	温 度	时 间	循环数
预变性	95℃	3min	1
变性	95℃	10 sec	40
退火/延伸	60-65℃	30 sec*	
绘制溶解曲线	仪器自带程序		

5. 三步法 qPCR 按下方程序进行反应:

阶段	温 度	时 间	循环数
预变性	95°C	3min	1
变性	95°C	10 sec	40
退火	55-65°C	10 sec	
延伸	72°C	30 sec*	
绘制溶解曲线	仪器自带程序 ^a		

a. 实验中使用仪器机型不同, 熔解曲线采集程序也有不同, 通常使用仪器确认溶解曲线采集程序即可。

*荧光信号采集。

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 qPCR Mix-SYBR 应避免反复冻融, 否则会影响 PCR 效率。

保存条件

试剂盒 Part I 2~8°C 保存, Part II -25°C ~ -15°C 保存, 保质期 1 年, ≤0°C 运输。

技术支持

本公司产品使用过程中如有任何疑问与建议, 欢迎随时与我们联系:

product@tsingke.com.cn。



关联产品推荐

产品名称	货号	应用
RNAprep FastPure 动物组织/细胞总 RNA 提取试剂盒（双柱型）	TSP413	动物与细胞总 RNA 提取
1.1×EasyQ SYBR qPCR Mix (Low ROX Premixed)	DLQ103	适用于 SYBR Green I 染料法检测及分析的荧光定量实验
SynScript® III 一管式逆转录试剂（去基因组）	DLR102	一管式一步法逆转录预混液

说明书版本号

1.1.2.Q105.2509

