

Code No. 3735A

研究用

TAKARA

CellAmp™ Direct TB Green®
RT-qPCR Kit

说明书

目 录

内 容	页 码
● 制品说明	1
● 制品特点	1
● 制品内容	2
● 保 存	2
● 使用注意	3
● 操作方法	3
● 实验例：基因表达图表分析	6
● Troubleshooting	7
● 关联产品	7

● 制品说明

CellAmp Direct TB Green RT-qPCR Kit 是无需对 96 孔板或者其他板上培养的各种动物细胞进行 RNA 提取 (cell line 化的贴壁细胞和悬浮细胞、原代培养细胞、各种干细胞、iPS 细胞等), 只需简单的操作就可以进行 Real Time RT-PCR 的试剂盒。使用该试剂盒, 从培养细胞起始, 最短仅需 1.5 小时便可以完成从模板制备到反转录反应及基因表达分析等操作。此外, 能够有效去除基因组 DNA, 对于有基因组 DNA 混入而出现问题的解析 (设计 Primer 不跨内含子, 基因表达量低样品) 也可以很好的发挥作用。TB Green 检测用的两步法 Real Time RT-PCR 试剂也包含在此试剂盒中, 无需另行准备, 即可轻松地进行基因表达分析。

* 试剂盒中的 qPCR 试剂与 TB Green Fast qPCR Mix (Code No. RR430S/A/B) 相同, 使用不够时请另行购买。

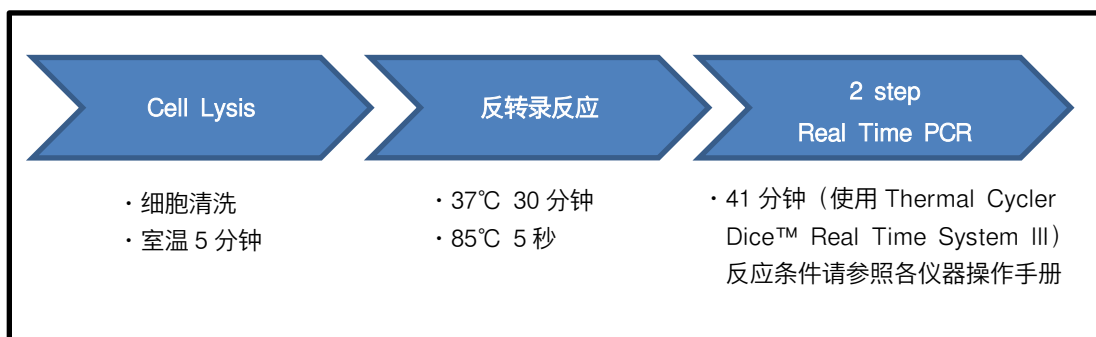


图 1. 解析流程

● 制品特点

1. 高通量解析操作简单, 大幅缩短解析时间 (最短 1.5 小时)
无需进行 RNA 提取, 可直接以细胞为模板制备样品。另外, 与以前产品 (CellAmp Direct RNA Prep Kit for RT-PCR (Real Time) Code No. 3732) 相比, 不需要进行反转录前的 DNase 失活处理, 减少了繁琐的操作, 也可以得到高通量的解析结果。
2. 干细胞、iPS 分化得到的细胞也可以使用
通过对 Lysis Buffer 的改良, cell line 化的贴壁细胞, 悬浮细胞, 原代培养细胞, 各种干细胞, iPS 细胞等均可以使用。*
* 请参照使用 iPS 细胞分化的心肌细胞进行的实验例【实验例: 基因表达图表解析】。
3. 裂解液可长期保存
-20°C 可稳定保存 6 个月。
4. 强抗阻害性和高特异性
使用 TB Green Fast qPCR Mix (Code No. RR430S/A/B) 试剂进行 Real Time PCR, 对 PCR 阻害物有很强抵抗力。另外, 稍长的目的基因和高 GC 含量的目的基因也可以扩增。

● 制品内容

CellAmp Washing Buffer* ¹	2.5 ml × 5
CellAmp Lysis Buffer II* ¹	1 ml × 5
DNase I for Direct RNA Prep* ¹	200 μl
Stop Solution* ¹	250 μl
PrimeScript™ RT Enzyme Mix* ²	200 μl
5X CellAmp Buffer II* ²	400 μl
RT Primer Mix* ² 、* ³	100 μl
RNase Free H ₂ O* ²	1 ml × 2
TB Green Fast qPCR Mix (2X)* ⁴	625 μl × 10
ROX Reference Dye (50X) * ⁴ 、* ⁵	250 μl
ROX Reference Dye II (50X) * ⁴ 、* ⁵	250 μl

*1 Cell Lysis 用试剂，100 次量。

*2 RT (反转录) 试剂，100 次量。

*1 和*2 使用不够时，可另行购买：

- CellAmp Direct Lysis and RT set (Code No. 3737S/A)：*1 和*2 的试剂
- CellAmp Direct Lysis set (Code No. 3738A)：*1 的试剂
- CellAmp Direct RT Enzyme set (Code No. 3739A)：*2 的试剂

*3 包含 Oligo dT Primer 和 Random 6 mers。

*4 qPCR 试剂，500 次量。

与 TB Green Fast qPCR Mix (Code No. RR430S/A/B) 相同，使用不够时请另行购买。

*5 用于需要进行孔间荧光信号校正的仪器解析，如 Applied Biosystems Real Time PCR 仪器等。

◆ 需要添加 ROX Reference Dye (50X) 的仪器

- Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific)
- StepOnePlus Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific)

◆ 需要添加 ROX Reference Dye II (50X) 的仪器

- Applied Biosystems 7500/7500 Fast Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific)

◆ 不需要添加的仪器

- Thermal Cycler Dice Real Time System III (Code No. TP950/TP970/TP980/TP990)
- Thermal Cycler Dice Real Time System // (Code No. TP900/TP960: 终卖)
- Thermal Cycler Dice Real Time System *Lite* (Code No. TP700/TP760: 终卖)
- LightCycler 96/LightCycler 480 System (Roche Diagnostics)
- CFX96 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- Smart Cycler System/Smart Cycler II System (Cepheid)

● 保存：-20℃

CellAmp Washing Buffer 和 CellAmp Lysis Buffer II

融解后置于4℃保存，注意防止污染。

TB Green Fast qPCR Mix (2X)

- 4℃可稳定保存6个月。避光保存，避免污染。
- 长期保存时请于-20℃保存。TB Green Fast qPCR Mix (2X) 融解后可4℃保存，于6个月内使用完。
- 使用时要完全融解且颠倒混匀。

● 使用注意

以下为使用本试剂盒时的注意事项，使用前一定认真阅读。

1. 细胞裂解液的制备要迅速，不要停滞。
2. 分装试剂时要使用一次性枪头避免样品之间的污染。
3. RNA 操作时的注意事项
 - 市售的灭菌一次性 Tube 通常认为是 RNase free 的产品，可直接用于实验，Microtube 和微量移液器使用的枪头需要灭菌处理后再使用。
 - 玻璃器具、匙等使用前需要 160°C 干热灭菌至少 2 小时以上。对于无法干热灭菌的耗材，使用 0.1% 的 DEPC 水在 37°C 处理 12 小时，然后高压灭菌。用于 RNA 实验的器具请与其他类实验用的器具分开存放。
 - 样品制备的过程中还需要其他防污染措施，包括使用无菌一次性手套以及口罩等防止汗液及唾液造成的污染。

● 操作方法

1. Lysis 溶液准备

使用 Microtube 在冰上配制以下溶液。

试 剂	使用量
CellAmp Lysis Buffer II	48 μ l
DNase I for Direct RNA Prep	2 μ l
Total	50 μ l

2. 裂解液的制备 (Lysate 溶液)

【96 孔板培养的贴壁细胞】

- 1) 充分吸除培养基。
- 2) 各个孔内加入 CellAmp Washing Buffer 125 μ l 清洗细胞。
- 3) 尽量吸尽 CellAmp Washing Buffer。
- 4) 各孔中加入上述 1. 中制备的溶液 50 μ l (Lysis 溶液)，室温 (25°C 左右) 静置 5 分钟。
- 5) 孵育后加入 2.5 μ l Stop Solution，吸打混匀 5 次左右。^{*1}

^{*1} 50 μ l 的裂解液 (Lysate 溶液) 请加入 2.5 μ l 的 Stop Solution。依实验需要，加入的 Lysate 溶液量增大时需相应增大 Stop Solution 的量。

例如，100 μ l 的裂解液 (Lysate 溶液) 相应加入 5 μ l 的 Stop Solution。

※ 细胞数的基本要求是每孔 1×10^4 cells，该试剂盒可以使用的范围是 $1 \times 10^2 \sim 1 \times 10^6$ cells。在此范围内，均可使用 50 μ l Lysis 溶液。

【使用 Tube 回收的细胞】

使用经第一次传代培养后的细胞或培养量很大的悬浮细胞时，请参照以下方法进行制备。

- 1) 将细胞转移至适当大小的离心管中。
- 2) 以适于各细胞的速度进行离心，沉降细胞。^{*2}
- 3) 尽量吸除培养基。
- 4) 加入 CellAmp Washing Buffer 125 μ l 清洗细胞。
- 5) 以适于各细胞的速度进行离心，沉降细胞。^{*2}
- 6) 尽量吸除 CellAmp Washing Buffer。
- 7) 加入 50 μ l 上述 1. 中制备的溶液 (Lysis 溶液)，室温 (25°C 左右) 静置 5 分钟。
- 8) 孵育后加入 2.5 μ l Stop Solution，吸打混匀 5 次左右。

*2 不同细胞的离心条件不同，请使用适合于所用细胞的离心速度进行离心。

例：HeLa 细胞的离心条件：1,500 rpm 离心 5 分钟。

注 1 一般的细胞株经培养后得到的细胞 Lysate 溶液可冰上稳定放置至少 2 小时。

注 2 细胞 Lysate 溶液长期保存时，请置于-20℃。该 Lysate 溶液可-20℃稳定保存 6 个月。

3. RT (反转录) 反应

1) 按下述方法制备 Master Mix，制备完成后取 18 μ l 加至反应管或反应板中。

试剂	使用量	终浓度
5X CellAmp Buffer II	4 μ l	1X
PrimeScript RT Enzyme Mix	1 μ l	
RT Primer Mix	1 μ l	
RNase Free H ₂ O	12 μ l	
Total	18 μ l	

※对于反转录反应，每 20 μ l 反应液中最多可以添加 2 μ l 的 PrimeScript RT Enzyme Mix。

如有必要，反转录反应液可以按比例放大，细胞 Lysate 溶液添加量请控制在反应液的 1/10 以下。

2) 取 2 μ l 上述 2.中制备的细胞 Lysate 加入到反应管或反应板中，冰上保存。

3) 按下述条件进行反转录反应：

37℃ 30 分钟 (反转录反应)

85℃ 5 秒 (反转录酶失活)

4℃

4. Real Time PCR 反应

【使用 Thermal Cycler Dice Real Time System III (// 和 Lite : 终卖) 等不需要 ROX Reference Dye 校正的 qPCR 装置*1 时的操作方法】

*1 使用 LightCycler 96/480 System、CFX96 Real-Time PCR Detection System、Smart Cycler System/Smart Cycler II System 时，请参照 TB Green Fast qPCR Mix (Code No. RR430S/A/B) 的说明书进行操作。

1) 按下列组份配制 PCR 反应液 (反应液配制请在冰上进行)。

<1 反应体系>

试剂	使用量	终浓度
TB Green Fast qPCR Mix (2X)	12.5 μ l	1X
PCR Forward Primer (10 μ M)	1 μ l	0.4 μ M*2
PCR Reverse Primer (10 μ M)	1 μ l	0.4 μ M*2
反转录反应液*3	4 μ l	
灭菌水	6.5 μ l	
Total	25 μ l*4	

*2 通常引物终浓度为 0.4 μ M 可以得到较好结果。反应性能较差时，可以在 0.2~1.0 μ M 范围内调整引物浓度。

*3 用于 Real Time PCR 的反转录反应液的量控制在 16% 以内。

*4 Thermal Cycler Dice Real Time System 系列的反应液量推荐使用 25 μ l。

2) 开始 Real Time PCR 反应。

建议采用下面的 Shuttle PCR 标准操作流程进行 PCR 反应。

首先尝试使用下面的操作流程，必要时进行 PCR 反应条件的优化。使用 T_m 值较低的引物等进行 Shuttle PCR 难以扩增时，进行三步法 PCR 扩增反应。

Shuttle PCR 扩增标准操作流程:

Hold (预变性)

Cycle: 1

95°C 30 秒

2 Step PCR

Cycles: 40

95°C 5 秒

60°C 10 秒

Dissociation

◆ 特别提示:

本制品中使用的改良型 *Taq* HS 是利用抗 *Taq* 抗体的 Hot Start 用 DNA 聚合酶, 与其他公司的化学修饰型 Hot Start 用 DNA 聚合酶相比, 不需要 PCR 反应前的 95°C、5~15 分钟的酶的活性化反应。如果高温处理时间过长, 会使酶的活性下降, 其 PCR 的扩增效率、定量准确度等都会受到影响。如果在 PCR 反应前进行模板的预变性, 通常设定为 95°C、30 秒。

- 3) 反应结束后确认 Real Time PCR 的扩增曲线和融解曲线。
分析方法请参考仪器的说明书。

【使用 Applied Biosystems 7300/7500/7500 Fast Real-Time PCR System 和 StepOnePlus Real-Time PCR System 等需要 ROX Reference Dye 校正的 qPCR 装置时的操作】

※请参考各仪器的说明书进行操作。

<1 反应体系>

- 1) 按下列方法配制 PCR 反应液。

试剂	使用量	终浓度
TB Green Fast qPCR Mix (2X)	12.5 μ l	1X
PCR Forward Primer (10 μ M)	1 μ l	0.4 μ M ^{*1}
PCR Reverse Primer (10 μ M)	1 μ l	0.4 μ M ^{*1}
ROX Reference Dye (50X) or Dye II (50X) ^{*2}	0.5 μ l	1X
反转录反应液 ^{*3}	4 μ l	
灭菌水	6 μ l	
Total	25 μ l	

*1 通常引物终浓度为 0.4 μ M 可以得到较好结果。反应性能较差时, 可以在 0.2~1.0 μ M 范围内调整引物浓度。

*2 ROX Reference Dye II (50X) 比 ROX Reference Dye (50X) 浓度低, 使用 Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System 和 7500 Fast Real-Time PCR System 时, 请使用 ROX Reference Dye II (50X)。

使用 StepOnePlus 和 7300 Real-Time PCR System 时, 请使用 ROX Reference Dye (50X)。

*3 用于 Real Time PCR 反转录反应液的添加量控制在 16%以内。

- 2) 开始 Real Time PCR 反应。

建议采用下面的 Shuttle PCR 标准操作流程进行 PCR 反应。

首先尝试使用下面的操作流程, 必要时进行 PCR 反应条件的优化。使用 T_m 值较低的引物等进行 Shuttle PCR 难以扩增时, 进行三步法 PCR 扩增反应。

<Applied Biosystems 7300/7500 Real-Time PCR System、StepOnePlus>

Shuttle PCR 扩增标准操作流程:

Stage 1: 预变性

Reps: 1

95°C 30 秒

Stage 2: PCR 反应

Reps: 40

95°C 5 秒

60°C 10-15 秒*

Stage 3: Melt Curve

*: 选择所使用的荧光通道 (FAM、ROX), 通过选择的荧光通道可以设定最短的检测时间。StepOnePlus 可以设定为 10 秒。

<Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System>

Shuttle PCR 扩增标准操作流程:

Holding Stage

Reps: 1

95°C 30 秒

Cycling Stage

Number of Cycles: 40

95°C 3 秒

60°C 12-15 秒*

Melt Curve Stage

*: 选择所使用的荧光通道 (FAM、ROX), 通过选择的荧光通道可以设定最短的检测时间。

◆特别提示:

本制品中使用的改良型 *Taq* HS 是利用抗 *Taq* 抗体的 Hot Start 用 DNA 聚合酶, 与其他公司的化学修饰型 Hot Start 用 DNA 聚合酶相比, 不需要 PCR 反应前的 95°C、5~15 分钟的酶的活性化反应。如果高温处理时间过长, 会使酶的活性下降, 其 PCR 的扩增效率、定量准确度等都会受到影响。如果在 PCR 反应前进行模板的预变性, 通常设定为 95°C、30 秒。

3) 反应结束后确认 Real Time PCR 的扩增曲线和融解曲线。分析方法参见仪器的说明书。

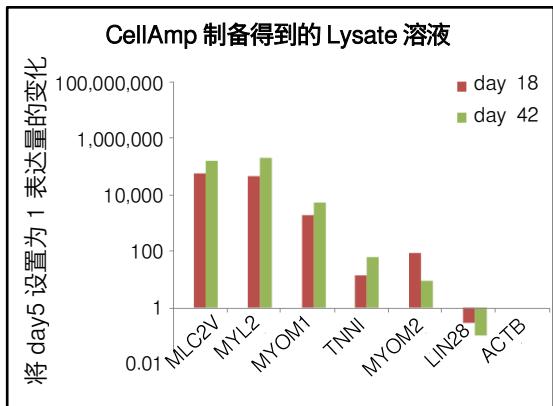
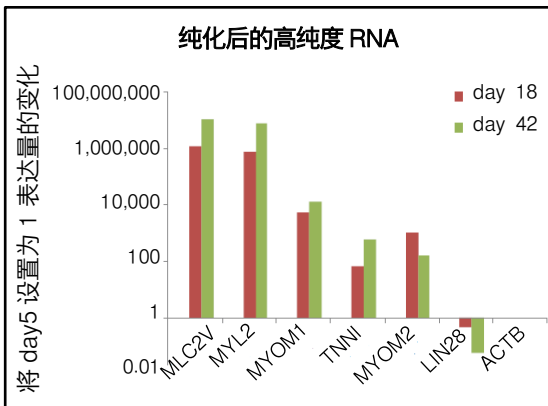
● 实验例: 基因表达图表分析

1. 实验方法

iPS 诱导分化形成心肌细胞, 分化诱导开始第 5 天, 第 18 天, 第 42 天后 (分别标记为 day5, day18, day42) 使细胞数为 1×10^4 cells 后回收细胞, 按照说明书制备 50 μ l 的 Lysate 溶液, 再进行反转录反应及 Real Time PCR 基因表达分析。对照组是使用纯化的 Total RNA (1×10^4 cells 细胞提取得到的 RNA), 进行同样的基因表达分析。

2. 实验结果

将 day5 设置为 1, 然后比较表达量的变化。图表结果显示, 使用 CellAmp 制备的 Lysate 溶液与使用纯化的高纯度 RNA 具有相同的基因表达量结果。



● Troubleshooting

<Real Time RT-PCR 无扩增产物>

1. 使用 NucleoSpin RNA (Code No. 740955.10/.50/.250) 或 RNAiso Plus (Code No. 9108/9109) 等纯化得到高纯度的 Total RNA 作为对照进行 Real Time RT-PCR, 确认是否可以获得扩增产物。
2. 对 PCR Primer 设计进行确认。能够有效地进行 Real Time RT-PCR 反应, PCR 引物的设计是至关重要的。PCR 引物的设计方法可参考 Takara Bio 官方网站。另外, 还可参照各 Real Time PCR 试剂说明书中【引物设计】部分。
3. 根据使用细胞的种类及培养条件, 调整实验方法和细胞浓度。
4. 使用 CellAmp Washing Buffer 清洗细胞, 去除细胞培养液中含有的杂质。此外, 请尽量去除培养基及 CellAmp Washing Buffer。
5. 请在冰上配制 Real Time PCR 反应液, 配好后至反应开始前请在冰上避光保存。
6. 进行 2 Step Real Time PCR 时, 如果在反转录反应中加入过量的 Lysate 溶液, 反应效率会降低。

● 关联产品

【Real Time PCR 试剂】

TB Green[®] Fast qPCR Mix (Code No. RR430S/A/B)

【Real Time PCR 仪器】

Thermal Cycler Dice[™] Real Time System III (Code No. TP950/TP970/TP980/TP990)

CronoSTAR[™] 96 Real-Time PCR System (Code No. 640231/640232)

CronoSTAR[™] Portable Real-Time PCR System (Code No. 640245/640247/640249)

【Probe 检测用】

CellAmp[™] Direct Probe RT-qPCR Kit (Code No. 3736S/A)

【补充试剂】

CellAmp[™] Direct Lysis and RT set (Code No. 3737S/A)

CellAmp[™] Direct Lysis set (Code No. 3738A)

CellAmp[™] Direct RT Enzyme set (Code No. 3739A)

TB Green is a registered trademark of Takara Bio Inc.

CellAmp, PrimeScript, Thermal Cycler Dice, and CronoSTAR are trademarks of Takara Bio Inc.

注意

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。

未经 Takara Bio Inc. 书面许可授权或批准，不得制造、许诺销售、销售、进口 Takara 产品，或者使用 Takara 产品所有的相关专利及相关商标。

如果您需要其他用途的许可授权，请联络我们，或访问我们网站 www.takarabio.com。

您使用本产品必须遵守产品网页上适用的全部许可要求。阅读、了解并遵守此类声明的所有限制性条款是您的责任。

所有商标均属于各自商标所有者的财产。某些商标并未在全部行政区注册。

本文件由宝日医生物技术（北京）有限公司翻译制作，最新版本文件请参考 Takara Bio Inc. 网站。为正确使用 Takara 产品，您应当掌握本产品的相关知识和使用说明。

技术咨询热线：

0411-87641685, 87641686

4006518761, 4006518769

TAKARA BIO INC.

URL: <https://www.takarabiomed.com.cn>

v202112Da