

EZPress 1-Step Cell to Ct Kit II (for Probe, ROX2)

说明书

Cat. No.: B0018-R2

一、产品简介

本试剂盒是直接以细胞裂解产物为模板进行探针法RT-qPCR检测的试剂盒。使用基因特异性引物（GSP），使逆转录和qPCR反应在同一个反应体系中完成，可在单次多通路反应中对多达三种不同的RNA/DNA靶标进行高灵敏度和高度重复性的检测。

本试剂盒含有四管试剂：Cell Lysis Buffer N2、10× Probe C-to-Ct Enzyme Mix II、5× Probe C-to-Ct Buffer II-R2和Nuclease-free ddH₂O。无需提取RNA，只需用本试剂盒提供的裂解液裂解细胞，然后在反应体系中加入酶、Buffer、引物、探针和适量的细胞裂解产物，再加Nuclease-free ddH₂O至指定体积，即可完成逆转录和qPCR反应，无需额外的开管和移液，大大提高了检测的通量、降低了检测的时间及污染的风险。使用本产品进行RT-qPCR反应，可以在宽广的定量区域内得到良好的扩增曲线，对靶基因表达进行准确的定量检测，重复性好，可信度高。

二、产品组分

组分	B0018-R2-S (100 Rxns)	B0018-R2 (500 Rxns)	B0018-R2-L (2500 Rxns)	B0018-R2-XL (10000 Rxns)
Cell Lysis Buffer N2	5.5 ml	5.5 ml × 5	5.5 ml × 25	(5.5 ml × 25)/Bag × 4
10× Probe C-to-Ct Enzyme Mix II ^{*1}	220 µl	1.1 ml	1.1 ml × 5	(1.1 ml × 20)/Bag
5× Probe C-to-Ct Buffer II-R2 ^{*2}	440 µl	1.1 ml × 2	1.1 ml × 10	(1.1 ml × 40)/Bag
Nuclease-free ddH ₂ O	1 ml	1 ml × 2	10 ml × 2	(10 ml × 8)/Bag

注：*1. 包含 M-MLV 突变体逆转录酶、RNase Inhibitor 和热启动 DNA 聚合酶；*2. 包含 dNTPs、低浓度的 ROX2 及高度优化的缓冲液体系。

三、保存条件

本试剂盒所有组分建议置于-20°C 避光保存，可保存 12 个月。过期日期详见产品标签中有效期信息。

四、适用的仪器型号（如果仪器不在下表中，请使用 B0018-R1）

ABI 7500, 7500 Fast, Quant-Studio 1, 3, 5, 6, 7, 12K Flex, Dx, ViiA™7; Aligent AriaMx, Stratagene MX4000™, MX3000P™, MX3005P™.
Bio-Rad CFX96™, CFX384™, iCycler iQ™, iQ™5, MyiQ™, MiniOpticon™, Opticon®, Opticon 2, Chromo4™; Roche LightCycler™ 96, Roche LightCycler™ 480; Eppendorf Mastercycler® ep realplex, realplex 2s; Illumina Eco qPCR; Qiagen/Corbett Rotor-Gene® Q, Rotor-Gene® 3000, Rotor-Gene® 6000; Thermo Scientific PikoReal Cyciler; Analytikjena qTOWER 3G; Cepheid SmartCycler®; Bioer Linegene 9600; HONGSHI SLAN®-96P.

五、注意事项

1. 反应液的配制请使用 RNase-free 或者灭过菌的吸头、EP 管等，尽量避免污染。
2. 建议优先使用 24 孔板培养细胞，48 或 96 孔板亦可，否则需要用胰酶消化后收集到 EP 管中进行裂解；对于悬浮细

胞，需要离心去除培养基，用 PBS 重悬后取一定数量的细胞转移到 EP 管中，离心去除 PBS 后再加入裂解液裂解。

3. 关于细胞密度：对于 24 孔板培养的细胞，建议收细胞时细胞密度达到 50~100% 为佳（约 20~40 万），30 万~40 万左右最好，以使所加裂解液能完全覆盖孔底。

4. 关于裂解液的用量：为充分裂解细胞，建议每 10 万细胞使用不少于 50 μl 的 Cell Lysis Buffer N2（裂解液）进行裂解；同时为简化操作，在进行高通量细胞裂解和 RT-qPCR 检测时，可按照 96 孔板每个细胞培养孔加 25~50 μl 裂解液、384 孔板每个孔加 15~20 μl 裂解液的用量进行细胞裂解。

5. 细胞从培养箱中取出后建议放在室温，切勿放在冰上，以免影响细胞状态。

6. 初次使用建议至少多养一个孔，以便在使用本试剂盒做实验时对细胞进行计数，之后可参考估数图进行估数。

7. 本试剂安全无毒，建议在开放环境进行实验即可；如果在通风橱内操作，建议不要开风机，以免吹干细胞导致 RNA 严重降解。

8. 对于一些细胞体积与常见细胞（比如 293T 细胞）的体积差异极大的细胞种类，建议进行预实验，确定一个合适的裂解液比例后再进行正式实验。

六、操作步骤

1. 使用前，将 Cell Lysis Buffer N2（裂解液）解冻后上下颠倒 10 次使之充分混匀，然后放在室温备用，请勿涡旋振荡；将 5 \times Probe C-to-Ct Buffer II-R2、Probe 和引物对解冻后上下颠倒 10 次使之充分混匀（非常重要），然后短暂离心至管底，放在冰上备用；10 \times Probe C-to-Ct Enzyme Mix II 无需解冻，从冰箱取出后上下颠倒 10 次使之充分混匀（非常重要），然后短暂离心至管底，放在冰上备用。

2. **裂解细胞**：吸去培养基，用 1 \times PBS 清洗细胞（沿侧壁加入适量 PBS 轻轻晃动后，再沿侧壁吸去 PBS；如果样品数较多，应分批操作，防止因细胞晾干导致 RNA 严重降解），按照 50 μl /10 万细胞的量加入裂解液。

2a. **摇床裂解（建议优先使用此方式）**：置于微量振荡器上室温振荡 5 min（转速 1500~2500 rpm）。

2b. **吹打裂解**：移液器充分吹打 30 下左右（吹打时须尽量把有细胞的区域全部吹到，以便完全裂解细胞，同时避免产生气泡），使细胞充分裂解。

注：如果 Cell Lysate（细胞裂解产物）后续需要继续使用，可在裂解后立即取部分裂解产物冻存于 -80 $^{\circ}\text{C}$ ，本产品的裂解产物可在 -80 $^{\circ}\text{C}$ 稳定保存 1 个月以上（-20 $^{\circ}\text{C}$ 可保存 2 周）。

3. 按照如下表格配制 RT-qPCR 反应体系：Cell Lysate 可直接用于配制 RT-qPCR 反应体系（按照下表推荐的用量）；10 \times Probe C-to-Ct Enzyme Mix II、5 \times Probe C-to-Ct Buffer II-R2、Probe、引物对和 Nuclease-free ddH₂O 配制成预混液，充分混匀后再依次加入到每个反应孔中**】**：

成分	10 μl 体系	20 μl 体系
10 \times Probe C-to-Ct Enzyme Mix II	1 μl	2 μl
5 \times Probe C-to-Ct Buffer II-R2	2 μl	4 μl
Probe*1 (10 μM)	0.1 μl	0.2 μl
Forward Primer*2,3 (10 μM)	0.2 μl	0.4 μl
Reverse Primer*2,3 (10 μM)	0.2 μl	0.4 μl
Cell Lysate	1 μl (0.5 μl ~ 1.5 μl)	2 μl (1 μl ~ 3 μl)
RNase free ddH ₂ O	补足到 10 μl	补足到 20 μl

注：*1. 关于探针浓度：探针的终浓度可以在 50~250 nM 之间调整；*2. 关于引物浓度：通常引物终浓度为 0.2 μM 即可得到较好的扩增效果，也可以根据情况在 0.1~1.0 μM 范围内调整引物终浓度；*3. 如需在同一个反应体系中检测多个基因，则可在同一个孔中加入至多 3 个基因的引物和探针。

4. 加样完成后，盖上封板膜并封紧，将孔板放入干净的自封袋、保鲜膜或保鲜袋中，再用一块孔板架倒置压住封板膜，Vortex 30 sec，或用力上下颠倒各 20 次充分振荡孔板，以使液体充分混匀，然后放入孔板离心机 1000 rpm 离心 1 min，将液体离心至 qPCR 孔板底部。

5. 按照如下程序进行 RT-qPCR 反应:

Step	1	2	3	
	逆转录反应	热启动酶活化	PCR 反应	
			循环数 (40 ~ 45 cycles)	
			解链	退火&延伸*2 (采集荧光信号)
温度	48°C	95°C*1	95°C	60°C
时间	5 min	5 min	10 sec	30 sec

注: *1. 95°C 反应 5 min 的目的是活化热启动酶; *2. 在退火&延伸这一步骤需要进行荧光信号的采集; 3. 不需要跑溶解曲线程序。

七、关于 qPCR 反应是否良好的判断

1. 如果扩增曲线呈典型的 S 型曲线, 荧光背景信号阶段、荧光信号指数扩增阶段及平台期均完整可见, 内参 Ct 值在合理范围内 (通常可在 13 ~ 22 之间, 典型的内参 Ct 值在 15 ~ 20 之间), 则可认为该反应正常;

2. 如果同一个模板和引物的重复孔的 Ct 值相差不超过 0.5;

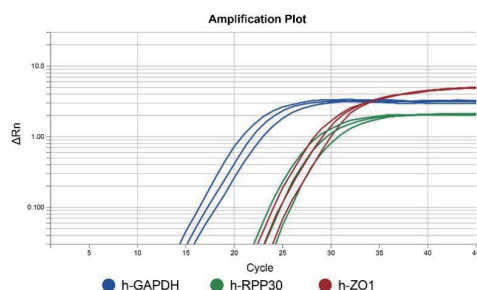
同时满足以上两个条件的可以认为数据可用。

八、qPCR 探针和引物的设计原则 (建议优先设计探针, 根据探针的情况设计引物)

序号	探针设计原则	引物设计原则
1	选择能使探针中 C 碱基比 G 碱基多的序列作为模板序列。	引物在探针序列确定好后再进行设计。
2	探针的位置: 探针不能紧邻基因序列的 5'端或 3'端 (因为引物需位于探针的外侧)。	正向引物或者反向引物应尽量接近探针序列, 但不能和探针序列有重合区域。
3	探针长度一般为 18 ~ 35 bp (18 ~ 30 bp 之间最佳)。	引物的最适长度为 17 ~ 25 bp。
4	探针 5'端应避免使用碱基 G。	引物 3'末端最后 5 个碱基不能包含超过 2 个以上的 G 或者 C。
5	探针序列中应避免连续相同的碱基出现, 特别是避免 GGGG 或者更多的连续 G 出现。	引物序列中应避免连续相同的碱基出现, 如果无法避免重复, 则连续 G 碱基必须少于 4 个。
6	探针的 GC 含量为 20% ~ 80%。	引物的 GC 含量为 20% ~ 80%。
7	对于单探针反应, 探针的 Tm 为 65 ~ 70°C。	引物的 Tm 值为 58 ~ 60°C。
8	如果序列中包含多态性位点, 应使其位于探针序列中间。	使用 Blast 检索确认引物的特异性。

九、代表性实验结果

如图所示为本试剂盒的 3 重探针法 RT-qPCR 实测结果图, 分别取 50 μ l 的 Cell Lysis Buffer N2 裂解 1 万、2 万和 4 万的 293T 细胞。RT-qPCR 体系为 20 μ l, 每孔分别加入 1 μ l 的细胞裂解产物和含 3 种不同引物探针的 RT-qPCR 预混液。



由上图可见, 本试剂盒的检测结果具有高度的特异性和灵敏度。表明本试剂盒可以很好的用于以细胞裂解产物为模板进行多重探针法 RT-qPCR 的检测。