

Cell12Ct-NB™ EF One-Step RT-qPCR Kit (TaqMan Method)

Cell12Ct-NB™ 免提取一步法 RT-qPCR 检测试剂盒（探针法）说明书 (Q1101, Q1102)

一. 产品描述

RT-qPCR 在基因表达检测及定量中使用极为广泛。传统的 RT-qPCR 虽然有一步法，但是涉及到样本 RNA 提取，过程繁杂，影响因素较多，检测通量很低。Cell12Ct-NB™ EF One-Step RT-qPCR Kit 是免提取（extraction-free）一步法 RT-qPCR 检测试剂盒，细胞洗涤后，直接加裂解液裂解，裂解液直接用作模版进行 RT-qPCR 扩增，从细胞准备到 PCR 结束可以在不到两小时的时间内完成，程序标准化，大大缩短了检测时间及影响因素，大大增加了检测通量。

本检测试剂盒为探针法（TaqMan probe），正式检测前 PCR 各参数需要先进行优化验证，以保证检测特异性及灵敏度。本检测试剂盒不包括 DNA 酶处理，因为 DNA 酶处理存在消化不完全的可能，残留 DNA 模板依然可能影响后期定量，同时 DNA 酶处理还存在灭活不完全的可能，残留 DNA 酶活性可能影响后期 PCR 扩增的 DNA 定量。因此，引物设计时需要以 RNA 序列为依据，扩增产品需要至少覆盖 2 个外显子，确保扩增系统不能以 DNA 为模板进行扩增，而只能以 RNA 为模板进行扩增。

二. 产品组成

本试剂盒由细胞裂解液 L 试剂，扩增缓冲液 B 试剂，扩增酶 mix E 试剂组成。具体规格如下：

目录号	L 试剂	B 试剂	E 试剂	可检测的 96-孔板孔数	可检测的 384-孔板孔数
Q1101	5 ml	1ml	400μl	100 wells	500 wells
Q1102	10x 5ml	10x 1ml	10x 400μl	1,000 wells	5,000 wells

三. 实验步骤

1. 细胞准备：待检测孔细胞需要在 25 至 15000 个细胞范围内。贴壁细胞吸去培养液后，用室温的 DMEM 无血清培养液洗涤一次，弃洗涤液后，加细胞裂解液。悬浮细胞离心吸去培养液后，用室温的 DMEM 无血清培养液洗涤一次，弃洗涤液后，加细胞裂解液。
2. 细胞裂解：96 孔培养板每孔加 50 μl L 试剂，384 孔培养板每孔加 10 μl L 试剂，轻拍培养板数次，室温振摇 10 至 15 分钟。细胞裂解产物（lysate）使用完之后需要尽快放回 2~8℃ 保存，低温保存时间不超过 8 小时。不建议长期保存细胞裂解产物。
3. RT-qPCR 准备：按下列次序准备 20 μl 反应体系：10 μl B 试剂，4 μl E 试剂，2 μl 引物探针 mix，2 μl 细胞裂解产物模板，2 μl 无酶水。20 μl 反应体系中细胞裂解产物不建议超过 2 μl。

4. RT-qPCR 扩增：逆转录 42~50℃, 20~30 分钟，然后 95℃ 1 分钟。qPCR 参数需要根据特定的目标基因及引物序列的预实验结果确定。以下是一个 housekeeping 基因的扩增设定，供参考：

逆转录：45℃，20 分钟；然后 95℃ 1 分钟。

PCR 扩增：94℃ 20 秒，56℃ 20 秒，65℃ 20 秒（收集荧光信号），35~40 个循环；然后 72℃ 3 分钟。

5. 必要时进行熔解曲线分析。
6. 结果分析。

四. 储存条件

Cell12Ct-NB™ 免提取一步法 RT-qPCR 检测试剂盒（探针法）于 -20℃ 或 -80℃。

五. 其它注意事项

1. 引物设计：需要以 RNA 序列为依据，扩增产物至少覆盖 2 个外显子，确保扩增系统不能以基因组 DNA 为模板进行扩增，而只能以 RNA 为模板进行扩增。在下列情况下可以实现：a. 2 个外显子之间的内含子比较长，以基因组为模板的扩增长度明显超出系统中的聚合酶在扩增延伸时间内所能完成的扩增长度；b. 2 个外显子之间的内含子比较短，但至少有一条引物的最 3 末端 2~5 个碱基与其 5 末端一侧的其余碱基分布在不同的外显子上且与邻近内含子碱基序列不同（参考下图），使得以 DNA 为模板的扩增成为不可能。必要时请联系产品技术支持协助。
2. 探针设计：探针长度 18~28 个碱基，Tm 比引物高 8~10℃，不含 3 个以上连续的 G，5 末端不是 G。探针 5 末端带荧光基团，3 末端带淬灭基团。
3. PCR 扩增参数及体系：任何一个 PCR，任何一套扩增引物探针，都需要经过预实验，确定最佳扩增温度与时间设定，引物量，酶量，甚至 Mg²⁺ 浓度调整，这对检测特异性与灵敏度非常重要。需要做类似细胞数梯度检测预实验，在获得良好的线性关系之后再开始微孔板高通量实验。
4. 熔解曲线：熔解曲线分析可以完美地区分特异性的与非特异性的扩增。熔解曲线分析在预实验实验参数确定过程中就需要使用。荧光探针扩增体系做熔解曲线前需要在扩增完成后加入双链 DNA 结合的荧光染料（如 SYBR Green），标记在探针上的荧光染料不能用于熔解曲线分析。

