

TaKaRa Code: D3732

**CellAmp™ Direct RNA Prep Kit
for Real Time RT-PCR
(96 孔板培养细胞 200 次量)**

说明书

TaKaRa

宝生物工程(大连)有限公司

目 录

内 容	页 码
●制品说明	1
●制品内容	1
●保 存	1
●使用注意	1
●操作方法	2
●操作流程	3
●Appendix	4
Appendix-1	4
Appendix-2	5
Appendix-3	6
Appendix-4	6
●实验例	8
●Troubleshooting	8

● 制品说明

本制品是从 96 孔板或其他各种培养板中培养的动物细胞中提取 One Step 或 Two Step Real Time RT-PCR 反应用的 RNA 模板的试剂盒。使用本试剂盒快捷方便，操作简单，可在 10 分钟内完成从培养细胞中制备品质良好的 RNA 模板。

使用本试剂盒制备的 RNA 模板可与 One Step SYBR® PrimeScript™ RT-PCR Kit II (Perfect Real Time) (TaKaRa Code: DRR086) 等 One Step Real Time RT-PCR 试剂组合使用，2 小时内便可完成基因检测分析。如果与反转录试剂 PrimeScript® RT reagent Kit (Perfect Real Time) (TaKaRa Code: DRR037) 组合使用，可在 30 分钟内完成 cDNA 合成。

本试剂盒制备的 RNA 可用于 Real Time RT-PCR 的高灵敏度检出，可对微量的细胞进行基因解析。在对不跨内含子的引物以及低表达量的基因进行分析时，基因组 DNA 的混入对实验结果影响很大。本制品中配有 DNase I，可以有效去除基因组 DNA，大大提高了实验结果的准确性。

● 制品内容（相当于 96 孔反应板培养细胞的 200 次量）

CellAmp™ Washing Buffer	12.5 ml × 2 支
CellAmp™ Processing Buffer	10 ml
DNase I for Direct RNA Prep	200 μl

【与本制品相关的 Real Time RT-PCR 关联制品】

One Step Real Time RT-PCR:

One Step SYBR® PrimeScript® RT-PCR Kit II (Perfect Real Time) (TaKaRa Code: DRR086)

One Step SYBR® PrimeScript® RT-PCR Kit (Perfect Real Time) (TaKaRa Code: DRR066)

One Step PrimeScript® RT-PCR Kit (Perfect Real Time) (TaKaRa Code: DRR064)

Two Step Real Time RT-PCR:

PrimeScript® RT reagent Kit (Perfect Real Time) (TaKaRa Code: DRR037)

SYBR® Premix DimerEraser™ (Perfect Real Time) (TaKaRa Code: DRR091)

SYBR® Premix Ex Taq™ II (Perfect Real Time) (TaKaRa Code: DRR081)

SYBR® Premix Ex Taq™ (Perfect Real Time) (TaKaRa Code: DRR041)

Premix Ex Taq™ (Perfect Real Time) (TaKaRa Code: DRR039)

SYBR® PrimeScript® RT-PCR Kit (Perfect Real Time) (TaKaRa Code: DRR063)

SYBR® PrimeScript® RT-PCR Kit II (Perfect Real Time) (TaKaRa Code: DRR083)

PrimeScript® RT-PCR Kit (Perfect Real Time) (TaKaRa Code: DRR061)

● 保存: -20℃。

CellAmp™ Washing Buffer 及 CellAmp™ Processing Buffer 溶解后也可以在 4℃ 保存。但请注意避免污染。

● 使用注意

- 1) CellAmp™ Washing Buffer 及 CellAmp™ Processing Buffer 在溶解过程中有析出物时，请于室温下完全溶解后使用。
- 2) 在细胞裂解液制备过程中要迅速进行，不要停滞。
- 3) 试剂在分装时必须使用新的一次性塑料手套及口罩，尽量避免试剂污染。

4) RNA 使用时的注意事项。

尽量使用一次性塑料器皿，若用玻璃器皿，应在使用前按下列①或者②方法进行处理。

① 干热灭菌 (180℃, 60 min)

② 使用 0.1% DEPC (焦碳酸二乙酯) 水溶液在 37℃ 下处理 12 小时, 然后在 120℃ 下高压灭菌 30 分钟以除去残留的 DEPC。

RNA 实验用的器具和仪器建议专门使用, 不要用于其它实验。

混入 RNase 的最大原因是由裸手操作带入的, 在进行 RNA 相关实验时必须使用一次性塑料手套及口罩。

● 操作方法

1. 按下列组份在冰上配制细胞 Processing 溶液 (使用 96 孔板时的每个孔量*)。

试 剂	使用量
CellAmp™ Processing Buffer	49 μl
DNase I for Direct RNA Prep	1 μl
Total	50 μl

*使用其它类型板时请参照 Appendix-3。

2. 贴壁培养细胞时的细胞裂解液的制备方法。

1) 向 96 孔板中*1 接种适量的细胞数。

*1: 细胞接种量请参照 Appendix-3。

2) 根据实验要求培养适量的细胞数或培养至细胞汇聚。

3) 用枪头尽量去尽培养基。

4) 向各孔中添加 125 μl*2 的 CellAmp™ Washing Buffer。

*2: 使用其它类型板时请参照 Appendix-3。

5) 用枪头尽量吸尽 CellAmp™ Washing Buffer。

6) 向各孔中添加 50 μl*3 上述配置好的细胞 Processing 溶液, 室温 (25℃ 左右) 放置 5 min。

*3: 使用其它类型板时请参照 Appendix-3。

7) 用枪头将各孔的细胞 Processing 溶液反复吸打后, 转移至适当容量的微量离心管中, 75℃ 水浴 5 min。

8) 使用上述操作得到的细胞裂解液, 按 “Appendix-1、2” 记述的 Real Time RT-PCR 相关试剂的操作流程进行 Real Time RT-PCR 反应*4。

*4: 进行 25 μl 反应体系的 One Step Real Time RT-PCR 时请务必使用 2 μl 以下的细胞裂解液。
制备的细胞裂解液应在冰上放置, 尽量在 20 min 内进行 Real Time RT-PCR 反应。细胞裂解液可在 -80℃ 保存 2 周左右。

3. 悬浮培养细胞时的细胞裂解液的制备方法。

1) 计算细胞数, 将低于 1×10^4 cells 的细胞培养液转移到适当容量的离心管中。

2) 300×g, 离心 5 min 后, 用枪头尽量去尽培养基。

3) 向各离心管中添加 125 μl*1 的 CellAmp™ Washing Buffer。

*1: 细胞数超过 1×10^4 cells 时, 根据细胞数按比例增加试剂的使用量。

4) 300×g, 离心 5 min 后, 用枪头尽量去尽 CellAmp™ Washing Buffer。

5) 添加 50 μl*2 上述配制好的细胞 Processing 溶液, 室温 (25℃) 放置 5 min。

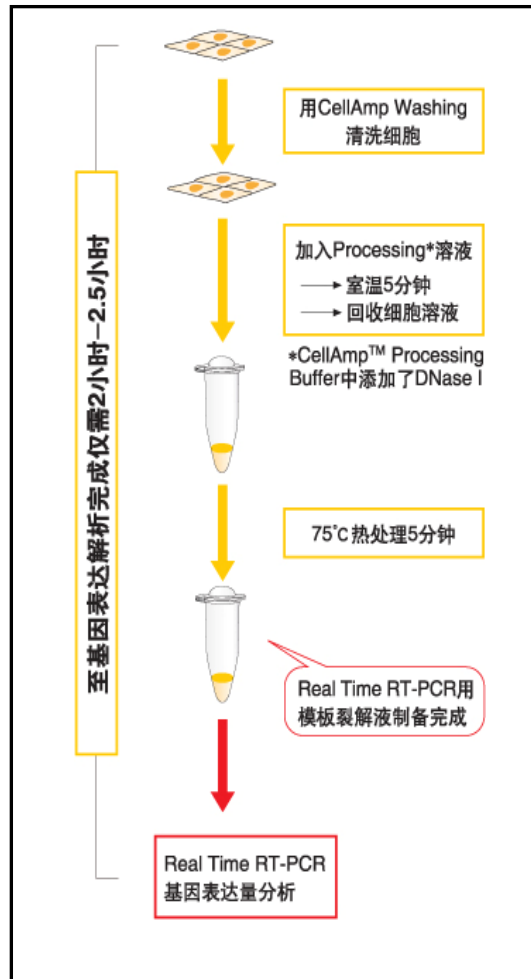
*2: 细胞数超过 1×10^4 cells 时, 根据细胞数按比例增加试剂的使用量。

6) 用枪头将细胞 Processing 溶液反复吸打后, 转移到适当容量的微量离心管中, 75℃ 水浴 5 min。

7) 使用上述操作得到的细胞裂解液，按照“Appendix-1、2”记述的 Real Time RT-PCR 相关试剂的操作流程进行 Real Time RT-PCR 反应*3。

*3: 进行 25 μ l 反应体系的 One Step Real Time RT-PCR 或 10 μ l 反应体系的反转录反应时，必须使用 2 μ l 以下的细胞裂解液。制备的细胞裂解液应在冰上放置，尽量在 20 min 内进行 Real Time RT-PCR 反应。细胞裂解液可在 -80 $^{\circ}$ C 保存 2 周左右。

● 操作流程



●Appendix

Appendix-1: 使用One Step SYBR® PrimeScript® RT-PCR Kit II (Perfect Real Time) (TaKaRa Code: DRR086) 进行One Step Real Time RT-PCR的实验例 (Real Time PCR仪使用Thermal Cycler Dice® Real Time System, TaKaRa Code: TP800)。

1) 在冰上将 1~2 μl*1 的细胞裂解液分装到反应管或反应板中。

*1: 25 μl 反应体系的 One Step Real Time RT-PCR 反应, 请添加 2 μl 以下的细胞裂解液。

2) 按下列组份在冰上配制 Master Mix。

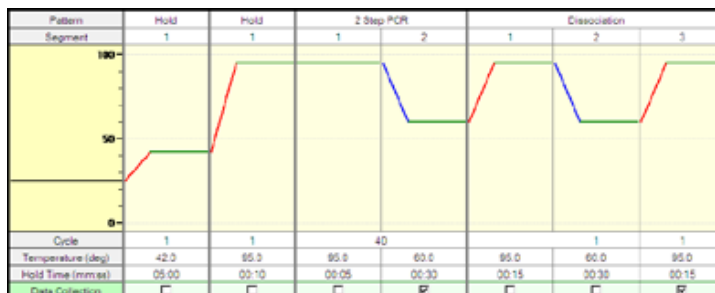
试剂	使用量	终浓度
2×One Step SYBR® RT-PCR Buffer 4	12.5 μl	1×
PrimeScript™ 1 Step Enzyme Mix 2	1 μl	
PCR Forward Primer (10 μM)	1 μl	0.4 μM*2
PCR Reverse Primer (10 μM)	1 μl	0.4 μM*2
RNase Free dH ₂ O	7.5~8.5 μl	
Total	23~24 μl	

*2: Primer 的最终浓度为 0.4 μM 时, 多数情况都能得到良好结果, 如果反应性能有问题, 请在 0.2~1.0 μM 范围内研讨最适浓度。

3) 向每份细胞裂解液中添加 23~24 μl的Master Mix (总体积 25 μl) 后混匀, 经轻微离心后, 放置于Thermal Cycler Dice® Real Time System上开始反应*3。

*3: 请先按照下述标准流程进行 Real Time RT-PCR 反应, 若有必要再将 PCR 反应条件优化。

T_m 值较低的 Primer 等在进行两步法 PCR 反应效果不好时, 请进行三步法 PCR。



Pattern 1: 反转录反应

Hold

42 °C 5 min

95 °C 10 sec

Pattern 2: PCR 反应

Cycle: 40

95 °C 5 sec

60 °C 30 sec

Pattern 3: Dissociation

◆特别提示:

本制品中使用的 *TaKaRa Ex Taq*TM 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、定量精度等都会受到影响。PCR 反应前的反转录酶的热变性失活通常设定为 95°C、10 sec。

4) 结果分析。

反应结束后, 确认 Real Time PCR 的扩增曲线和融解曲线。

Appendix-2 使用PrimeScript® RT reagent Kit (Perfect Real Time) (TaKaRa Code: DRR037) 与SYBR® *Premix Ex Taq*™ II (Perfect Real Time) (TaKaRa Code: DRR081) 进行 Two Step Real Time RT-PCR的实验例 (Real Time PCR仪使用Thermal Cycler Dice® Real Time System, TaKaRa Code: TP800)。

【反转录反应】

1) 按下列组份在冰上配制反转录反应的 Master Mix, 然后分装到反应管中。

试剂	使用量	终浓度
5×PrimeScript™ Buffer (for Real Time)	2 μl	1×
PrimeScript™ RT Enzyme Mix I	0.5 μl	
Oligo dT Primer (50 μM) *1	0.5 μl	25 pmol
Random 6 mers (100 μM) *1	0.5 μl	50 pmol
RNase Free dH ₂ O	4.5~5.5 μl	
Total*2	8~9 μl	

*1 Random 6 mers 和 Oligo dT Primer 同时使用, 可有效地将全长 mRNA 反转录成 cDNA。使用单引物进行反转录时, 使用量分别如下:

Random 6 mers (100 μM) 0.5 μl (50 pmol)
 Oligo dT Primer (50 μM) 0.5 μl (25 pmol)
 Specific Primer (2 μM) 0.5 μl (1 pmol)

*2 反应体系可按需求相应放大。

2) 向反转录反应Master Mix的反应管中添加1~2 μl*3细胞裂解液, 混匀后离心, 进行反转录反应。反转录反应的条件如下:

37℃ 15 min*4 (反转录反应)
 85℃ 5 sec (反转录酶热失活)
 4 °C

*3 10 μl的反转录反应中应添加2 μl以下的细胞裂解液。

*4 使用Gene Specific Primer时, 反转录反应条件请使用42℃ 15 min。如果Real Time PCR反应有非特异性产物生成时, 反转录温度提高至50℃对提高PCR反应特异性会有所改善。

【Real Time PCR反应】

3) 将2 μl*5的反转录反应液分装到反应管或反应Plate中, 冰上放置。

*5 反转录反应液在Real Time PCR反应体系中的添加量为反应液量的10%以下。

4) 按下列组份在冰上配制Master Mix。

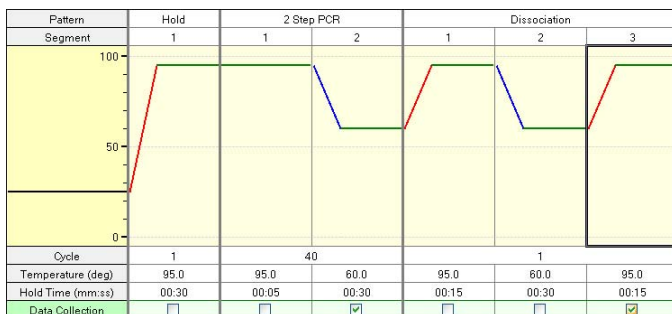
试剂	使用量	终浓度
SYBR® <i>Premix Ex Taq</i> ™ II (2×)	12.5 μl	1×
PCR Forward Primer (10 μM)	1 μl	0.4 μM*6
PCR Reverse Primer (10 μM)	1 μl	0.4 μM*6
dH ₂ O (灭菌蒸馏水)	8.5 μl	
Total	23 μl*7	

*6 Primer 的最终浓度为 0.4 μM 时, 多数情况都能得到良好结果, 如果反应性能有问题, 在 0.2~1.0 μM 范围内研讨最适浓度。

*7 反应液量推荐 25 μl。

5) 向分装好的反转录反应液中加入 23 μl的Master Mix后混匀, 经轻微离心后放置于Thermal Cycler Dice® Real Time System上开始反应*8。

*8: 请先按照下述标准流程进行 Real Time PCR 反应, T_m 值较低的 Primer 等在进行两步法 PCR 反应效果不好时, 请进行三步法 PCR。



Pattern 1: 预变性

Hold

95 °C 30 sec

Pattern 2: PCR 反应

Cycle: 40

95 °C 5 sec

60 °C 30 sec

Pattern 3: Dissociation

◆特别提示:

本制品中使用的 *TaKaRa Ex TaqTM 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、定量精度等都会受到影响。PCR 反应前的反转录酶的热变性失活通常设定为 95 °C、30 sec。

6) 反应结束后进行分析。

反应结束后, 确认 Real Time PCR 的扩增曲线和融解曲线。

Appendix-3 使用不同培养板进行贴壁细胞接种的接种量和各试剂的单孔使用量。

培养板	96 Well	48 Well	24 Well	12 Well	6 Well
细胞的接种量基准 (cells/well) *	1 × 10 ⁴	2 × 10 ⁴	4 × 10 ⁴	8 × 10 ⁴	2 × 10 ⁵
CellAmp TM Washing Buffer	125 μl	250 μl	500 μl	1 ml	2.5 ml
CellAmp TM Processing Buffer	49 μl	98 μl	196 μl	392 μl	980 μl
DNase I for Direct RNA Prep	1 μl	2 μl	4 μl	8 μl	20 μl

* 以上是接种的普通细胞在一般培养条件下的基准值。有时需根据接种的细胞种类、培养条件等对接种量进行调整, 对实验流程进行优化。

Appendix-4 Proteinase K 流程 (Option)

本制品按照“操作方法 1~3”进行裂解液制备, 通常能够得到较好的重复性。但对一次处理大量细胞样品等发现结果不好、Ct 值偏差较大时, 按照本流程进行裂解液的制备会有所改善。

* 按照本流程进行操作时, 请自备 Proteinase K (TaKaRa Code: D9033)。

1. 按下列组份在冰上配制细胞 Processing 溶液 (使用 96 孔板时 5 个孔量*)。

CellAmp TM Processing Buffer	199 μl
Proteinase K	1 μl
Total	200 μl

*: 使用其它类型板时请参照“Appendix-4.4”。

在冰上配制下述 DNase I 溶液 (使用 96 孔板时 1 个孔量*)。

CellAmp TM Processing Buffer	9 μl
DNase I for Direct RNA Prep	1 μl
Total	10 μl

* 使用其它类型板时请参照“Appendix-4.4”

2. 贴壁培养细胞时的细胞裂解液的制备方法。

1) 向 96 孔板*1 的各孔接种适量的细胞数。

*1: 细胞接种量请参照“Appendix-4.4.”。

2) 根据实验要求培养适量的细胞数或培养至细胞汇聚。

3) 用枪头尽量去尽培养基。

- 4) 向各孔中添加 125 μl *2 的 CellAmp™ Washing Buffer。
*2: 使用其它类型板时请参照“Appendix-4.4.”。
 - 5) 用枪头尽量去尽 CellAmp™ Washing Buffer。
 - 6) 向各孔中添加 40 μl *3 上述配置好的细胞 Processing 溶液, 室温 (25℃左右) 放置 5 min。
*3: 使用其它类型板时请参照“Appendix-4.4.”。
 - 7) 用枪头将各孔的细胞 Processing 溶液反复吸打后, 转移至适当容量的微量离心管中, 75℃水浴 5 min。
 - 8) 冰上冷却后, 向各样品中添加 10 μl *4 的 DNase I 溶液 (按“Appendix-4.1.”预先配制)。37℃水浴 5 min 后, 75℃放置 5 min。如果不进行 DNase I 处理时, 可直接进行下述 9) 的操作。
*4: 使用其它类型板时请参照“Appendix-4.4.”。
 - 9) 使用上述操作得到的细胞裂解液, 按“Appendix-1、2”记述的 Real Time RT-PCR 相关试剂的操作流程进行 Real Time RT-PCR 反应*5。
*5: 进行 25 μl 反应体系的 One Step Real Time RT-PCR 时请务必使用 2 μl 以下的细胞裂解液。制备的细胞裂解液应在冰上放置, 尽量在 20 min 内进行 Real Time RT-PCR 反应。细胞裂解液可在-80℃保存 2 周左右。
3. 悬浮培养细胞时的细胞裂解液的制备方法。
- 1) 计算细胞数, 将低于 1×10^4 cells 的细胞培养液转移到适当容量的离心管中。
 - 2) 300×g, 离心 5 min 后, 用枪头尽量去尽培养基。
 - 3) 向各离心管中添加 125 μl *1 的 CellAmp™ Washing Buffer。
*1: 细胞数超过 1×10^4 cells 时, 根据细胞数按比例增加试剂的使用量。
 - 4) 300×g, 离心 5 min 后, 用枪头尽量去尽 CellAmp™ Washing Buffer。
 - 5) 添加 40 μl *2 上述配制好的细胞 Processing 溶液, 室温 (25℃) 放置 5 min。
*2: 细胞数超过 1×10^4 cells 时, 根据细胞数按比例增加试剂的使用量。
 - 6) 用枪头将细胞 Processing 溶液反复吸打后, 转移到适当容量的微量离心管中, 75℃水浴 5 min。
 - 7) 冰上冷却后, 向各样品中添加 10 μl *3 的 DNase I 溶液 (按“Appendix-4.1.”预先配制)。37℃水浴 5 min 后, 75℃放置 5 min。如果不进行 DNase I 处理时, 可直接进行下述 8) 的操作。
*3: 使用其它类型板时请参照“Appendix-4.4.”。
 - 8) 使用上述操作得到的细胞裂解液, 按照“Appendix-1、2”记述的 Real Time RT-PCR 相关试剂的操作流程进行 Real Time RT-PCR 反应*4。
*4: 进行 25 μl 反应体系的 One Step Real Time RT-PCR 或 10 μl 反应体系的反转录反应时, 必须使用 2 μl 以下的细胞裂解液。制备的细胞裂解液应在冰上放置, 尽量在 20 min 内进行 Real Time RT-PCR 反应。细胞裂解液可在-80℃保存 2 周左右。
4. 使用不同培养板进行贴壁细胞接种的接种量和各试剂的单孔使用量如下表 (Proteinase K 流程)。

培养板	96 Well	48 Well	24 Well	12 Well	6 Well
细胞的接种量基准 (cells/well) *	1×10^4	2×10^4	4×10^4	8×10^4	2×10^5
CellAmp™ Washing Buffer	125 μl	250 μl	500 μl	1 ml	2.5 ml
【Processing 溶液】					
CellAmp™ Processing Buffer	39.8 μl	79.6 μl	159.2 μl	318.4 μl	796 μl
Proteinase K	0.2 μl	0.4 μl	0.8 μl	1.6 μl	4 μl
【DNase I 溶液】					
CellAmp™ Processing Buffer	9 μl	18 μl	36 μl	72 μl	180 μl
DNase I for Direct RNA Prep	1 μl	2 μl	4 μl	8 μl	20 μl

* 以上是接种的普通细胞在一般培养条件下的基准值。有时需根据接种的细胞种类、培养条件等对接种量进行调整, 对实验流程进行优化。

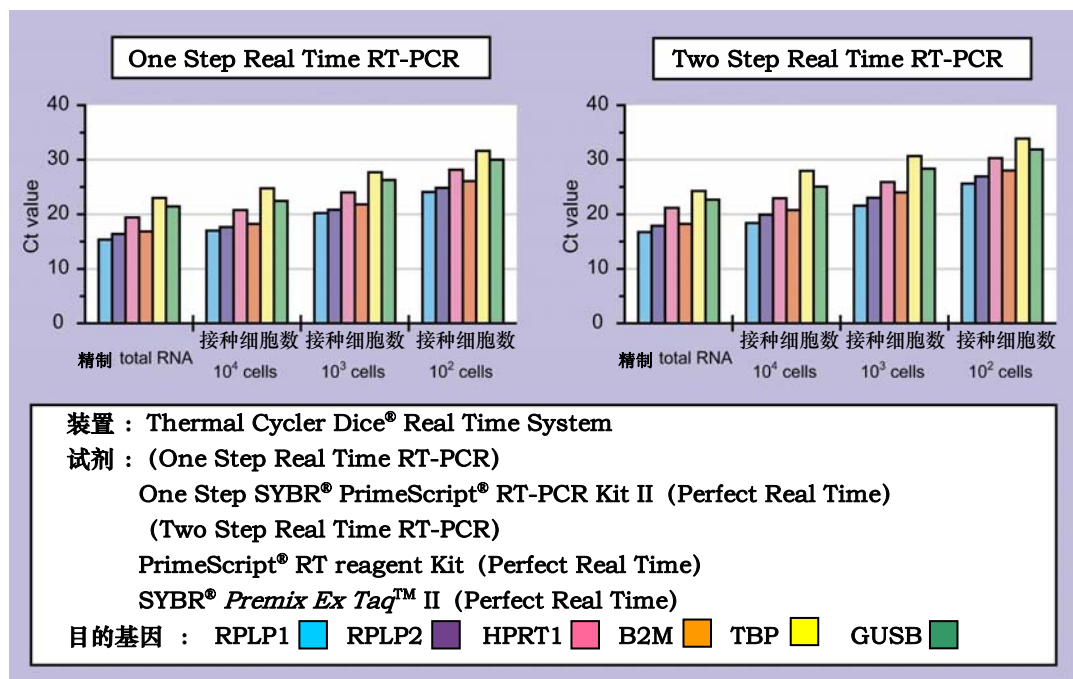
●实验例

1. 实验方法。

在 96 孔板中分别接种 1×10^4 、 1×10^3 、 1×10^2 cells/well 的 HeLa 细胞，培养 48 小时后，按照实验“操作方法”分别配制 50 μ l 的细胞裂解液。以各裂解液作为 One Step 及 Two Step Real Time RT-PCR 的模板，对 6 种目的基因进行表达量分析。同时使用由 RNAiso Plus 精制得到的 Total RNA (100 ng) 做实验对照，进行表达量分析对比。

2. 实验结果。

使用 One Step 与 Two Step Real Time RT-PCR 对不同的细胞数的目的基因进行表达量分析，均可得到与对照样品同样稳定的基因分析图表。



图：6 种目的基因的分析结果

●Troubleshooting

Real Time RT-PCR 无扩增产物。

- 1、用 RNAiso Plus (TaKaRa Code: D9108) 精制的高纯度 Total RNA 进行 Real Time RT-PCR，观察有无扩增。
- 2、对 PCR Primer 的设计进行确认。设计反应性能良好的 Primer，对提高 Real Time RT-PCR 的反应性能非常有效。
- 3、接种的细胞株及培养条件不同时，有必要对细胞的接种量进行研讨、优化实验流程。
- 4、使用 CellAmp™ Washing Buffer 对细胞进行洗净时，尽可能去除细胞中的杂质。
- 5、实验操作时应尽可能去尽培养基及 CellAmp™ Washing Buffer。
- 6、Real Time PCR 反应液请于冰上配制，配制后到反应开始期间应在冰上避光保存。
- 7、One Step 与 Two Step Real Time RT-PCR 反应时，如果添加的细胞裂解液过量会降低反应效率。

MEMO

技术咨询热线：

0411-87641685, 87641686
8008909508, 4006518769

宝生物工程（大连）有限公司

TaKaRa Biotechnology (Dalian) Co., Ltd.

辽宁省大连经济技术开发区东北二街 19 号 (116600)

No.19 Dongbei 2nd Street, Development Zone, Dalian, China

电 话： 0411-87641681 87641683

传 真： 0411-87619946 87621675

E.mail: service@takara.com.cn

网 址： <http://www.takara.com.cn>

V2010.04

本制品仅供研究用。请勿用于人体及动物的医疗、临床诊断或作为食品、化妆品、家庭用品的添加剂