

SuperPrep[®] II
Cell Lysis & RT Kit for qPCR
(Code No. SCQ-401)

SuperPrep[®] II
Cell Lysis Kit for qPCR
(Code No. SCQ-501)

使用说明书

目录

[1] 前言	1
[2] 产品内容	3
[3] 产品以外需要准备的物品	5
[4] 使用方法	5
[5] 荧光定量 PCR(例)	8
[6] 实验例	15
[7] Trouble Shooting	19
[8] 相关产品	19

【注意】

本产品为研究用试剂。请勿作为诊断，临床试剂使用。此外，对于产品的有害性调查还不十分全面，因此，在使用时，请严格遵守实验室的一般注意事项，适当使用防护用品，安全操作。

【保存】

所有组分请均保存于-20℃条件下

[1] 前言

SuperPrep® II Cell Lysis & RT Kit for qPCR (Code: SCQ-401)是为了能够用荧光定量 PCR 法进行基因表达分析、由细胞裂解试剂(Lysis Reagents)和逆转录反应试剂(RT Reagents)组成的试剂盒。通过使用本产品，可以从 96 孔板等培养的细胞开始简便地制备含有可作为逆转录反应模板用 RNA 的细胞裂解液。而且，本试剂盒中含有的 RT Reagents 试剂，针对该细胞裂解液的 RT 反应进行了优化。在以前的 SCQ-101 中，Lysis Solution 之后，需要添加 Stop Solution。SuperPrep® II 中在 Lysis Solution 处理之后，可以直接进行 cDNA 合成步骤。此外，该试剂盒还可以对更多种类的哺乳类细胞进行高灵敏度的检测。使用本试剂盒，可以简便、迅速地从小培养细胞开始合成荧光定量 PCR 用的模板 cDNA。

SuperPrep® II Cell Lysis Kit for qPCR (Code: SCQ-501)是细胞裂解试剂的独立销售品。可用于 1-step 荧光定量 RT-PCR 简易分析时细胞裂解液的制备。

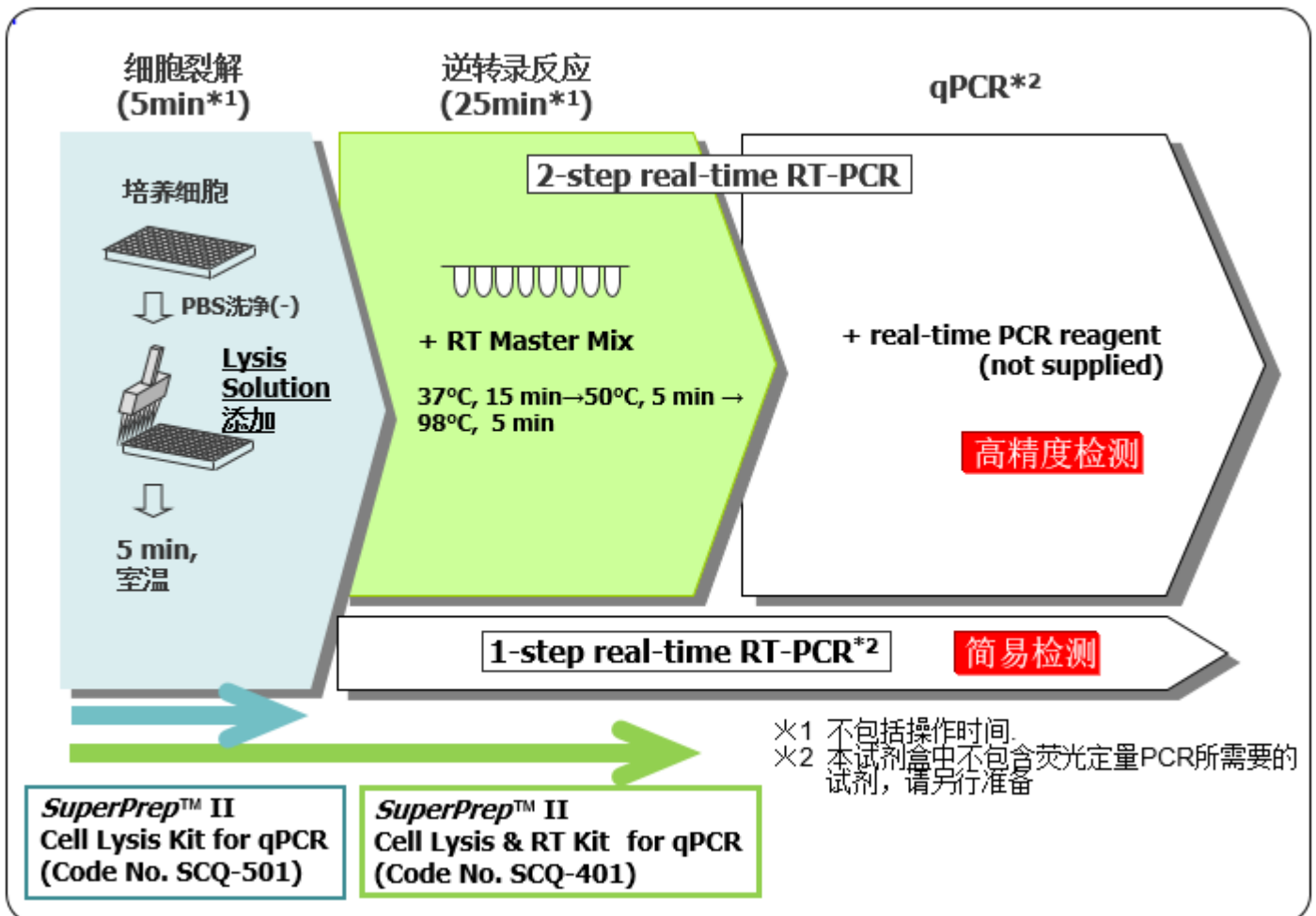


图. 使用本产品进行荧光定量 PCR 分析的流程

◆本产品的特征◆

1. 无需纯化 RNA

从培养细胞开始，可简便地制备含有可用于逆转录反应模板用 RNA 的细胞裂解液。以 Lysis Solution 处理过的裂解液为模板，直接就可以进行逆转录反应，可大幅度地缩短分析时间。

2. 从裂解液开始合成高品质的 cDNA

通过 buffer 组份的最优化，有效地抑制了因 RNase 等的细胞成分引起的 RNA 降解（制备好的 RNA 在冰上可稳定放置 6 小时）。另外，由于用 gDNA Remover (DNase I) 处理后再进行 cDNA 的合成，所以可以合成基因组 DNA 污染少的高品质 cDNA。逆转录试剂是用本公司的高效率逆转录酶「ReverTra Ace®」为基础进一步优化后的 Master Mix，可简便、高效率地合成 cDNA。合成的 cDNA 可长期保存。

3. 可适用于更多种的哺乳类细胞

SuperPrep® II 相比以前的 SCQ-101, 可适用于更多种类的哺乳类细胞的分析。

下表中这些代表性的细胞已确认可以使用。

表. 已确认本产品适用的细胞

	细胞名称	贴壁 / 悬浮	种类	细胞	来源
1	HPA	贴壁	H.sapiens	preadipocytes (primary cell)	前体脂肪细胞
2	HEK	贴壁	H.sapiens	epidermal keratinocytes (primary cell)	表皮角质细胞
3	HA	贴壁	H.sapiens	astrocytes (primary cell)	星形胶质细胞
4	HDF	贴壁	H.sapiens	dermal fibroblasts (primary cell)	皮肤纤维芽细胞
5	HFLS	贴壁	H.sapiens	fibroblast-like synoviocytes (primary cell)	成纤维样滑膜细胞
6	HBEPc	贴壁	H.sapiens	bronchial epithelial cells (primary cell)	支气管上皮细胞
7	HUVEC	贴壁	H.sapiens	umbilical vein endothelial cells (primary cell)	脐静脉内皮细胞
8	HPAEC	贴壁	H.sapiens	pulmonary artery endothelial cells (primary cell)	脐动脉内皮细胞
9	HC	贴壁	H.sapiens	chondrocytes (primary cell)	软骨细胞
10	HOb	贴壁	H.sapiens	osteoblasts (primary cell)	成骨细胞
11	HskMC	贴壁	H.sapiens	skeletal muscle cells (primary cell)	骨骼肌细胞
12	HAOSMC	贴壁	H.sapiens	aortic smooth muscle cells (primary cell)	主动脉平滑肌细胞
13	HFDPC	贴壁	H.sapiens	hair follicle dermal papilla Cells (primary cell)	人毛乳头细胞
14	HMSC	贴壁	H.sapiens	marrow stromal cell (primary cell)	骨髓间质细胞
15	A431	贴壁	H.sapiens	epidermoid carcinoma cell line	表皮癌细胞系
16	HeLa S3	贴壁	H.sapiens	cervix carcinoma cell line	宫颈癌细胞系



17	HepG2	贴壁	H.sapiens	hepatocellular carcinoma cell line	肝癌细胞系
18	C2C12	贴壁	M. musculus	myoblast cell line	成肌细胞
19	NIH-3T3	贴壁	M. musculus	embryo fibroblast cell line	胚胎纤维母细胞
20	MDCK	贴壁	C. familiaris	kidney cell line	肾脏细胞
21	CHO-K1	贴壁	C. griseus	ovary cell line	卵巢细胞系
22	Jurkat	悬浮	H.sapiens	T lymphocyte cell line	T 淋巴细胞系
23	K562	悬浮	H.sapiens	myelogenous leukemia cell line	粒细胞白血病细胞系
24	THP-1	悬浮	H.sapiens	acute monocytic leukemia cell line	急性单核细胞白血病细胞系
25	U937	悬浮	H.sapiens	leukemic monocyte lymphoma cell line	单核细胞白血病淋巴瘤细胞系
26	HMNC	悬浮	H.sapiens	mononuclear cells (primary cell)	单核细胞

4. 降低了高通量分析的误差

操作步骤上因为减少了移液分管及稀释操作步骤，降低了高通量分析时的误差。另外，细胞裂解时无需用移液枪头上下吹打混匀，而且进行了 gDNA Remover 处理，提高了操作性。无需添加终止反应液及进行引起 RNA 不稳定的加热操作。

5. 可使用各种荧光定量 PCR 试剂

可与各种荧光定量 PCR 试剂组合使用。可用于 SYBR® Green I 和 TaqMan® 两种分析方法。与本公司的 THUNDERBIRD® qPCR Mix (Code: QPS-101)、KOD SYBR® qPCR Mix (Code: QKD-201)等组合使用，可以从培养细胞开始进行简便且高度准确的基因表达分析。此外，与本公司的 RNA-direct™ Realtime PCR Master Mix (Code: QRT-101, QRT-201)、THUNDERBIRD® Probe One-step qRT-PCR Kit (Code: QRZ-101)等的 1-step 荧光定量 PCR 试剂组合使用，也可进行简易的分析

[2] 产品内容

本产品中含有以下试剂，可供 100 次反应使用（使用 96 孔板时）。试剂请于-20℃保存。

SuperPrep® II Cell Lysis & RT Kit for qPCR (Code: SCQ-401)

<Lysis Reagents>

试剂名称	保存	容量
Lysis Solution	-20℃或 2~8℃可保存 5 个月以内(注 1)	6.5ml
gDNA Remover	-20℃	33μl
RNase Inhibitor	-20℃	110μl

<RT Reagents>

试剂名称	保存(注 2)	容量
------	---------	----

5x RT Master Mix	-20℃	860μl
5x RT Master Mix no-RT Control	-20℃	86μl
Nuclease-free Water	-20℃	1.7ml x2

SuperPrep® II Cell Lysis Kit for qPCR (Code: SCQ-501)

[SCQ-401 的 Lysis Reagents 的单独销售品]

试剂名称	保存	容量
Lysis Solution	-20℃或 2~8℃可保存 5 个月以内(注 1)	6.5ml
gDNA Remover	-20℃	33μl
RNase Inhibitor	-20℃	110μl

注1) Lysis solution 在 2-8℃ 条件下可存放 5 个月。但是，添加过 gDNA Remover 的 Lysis solution 不建议保存在 2-8℃。

注2) 如果试剂需要长时间存贮，请放置在-30℃保存。

Lysis Solution

是经过优化过的并适用于 RT-qPCR 的细胞裂解试剂。该溶液中含有降低 RNase 活性的成分。添加试剂盒中附带的 RNase Inhibitor 和 gDNA Remover 后即可使用。在细胞裂解的同时进行基因组 DNA 的降解。

gDNA Remover

是本试剂盒中优化过的 DNase I 溶液。按 58.7μl Lysis Solution 中加入 0.3μl gDNA Remover 的比例进行添加后，可将测定时会产生背景信号的基因组 DNA 降解掉。

RNase Inhibitor

是本试剂盒中经过优化过的 RNase Inhibitor 溶液。按照 58.7μl Lysis Solution 添加 1μl 的比例进行添加使用，可以降低样品中 RNase 活性。

5x RT Master Mix

是含有高效逆转录酶 ReverTra Ace®、RNase inhibitor、Oligo dT Primer、Random Primer、反应 buffer、MgCl₂、dNTPs、glycerol(甘油)等的 5x 浓度的 Master Mix。使用该溶液之前，请先瞬时离心，使液体离心至管底。另外，因为该溶液具有粘性，请用移液器缓慢吸取。

5x RT Master Mix no-RT Control

是 5x RT Master Mix 中只去掉 ReverTra Ace®的 Master Mix。它可作为逆转录反应的对照组使用。与 5x RT Master Mix 相同，打开盖子之前，请先瞬时离心，使液体离心至管底。另外，因为该溶液具有粘性，请用移液器缓慢吸取。

Nuclease-free Water

Nuclease-free 级的灭菌蒸馏水。该蒸馏水未经对聚合酶活性可能有影响的焦碳酸二乙酯 (DEPC)处理。

[3] 产品以外需要准备的物品

除本产品之外，请准备以下的试剂及仪器。

- Thermal cycler 或者是 Incubator

请准备能保持本产品的 RT 反应推荐温度(37°C、50°C、以及 98°C)的仪器。

- 荧光定量 PCR 仪器及荧光定量 PCR 用的试剂

使用时请按各仪器，试剂使用说明书的指导进行。

[4] 使用方法

1. 细胞裂解液的制备

(1) 96 孔板培养的贴壁细胞

- ① 向 96 孔板内放入适当数量的细胞（例如: $1\sim 2\times 10^4$ cells）。

如果细胞数量过多，有可能会使得裂解不充分或对 RT-PCR 产生抑制，及基因组 DNA 不能被充分降解。本试剂一般可以处理 $1\times 10^1\sim 7\times 10^4$ cells 的细胞样品，因细胞种类不同会有些差异。以 104 个细胞为标准，建议在预实验中确认细胞数的上限。

- ② 根据实验条件，孵育细胞。
- ③ 将培养基从孔中弃掉。
- ④ 向各孔中加入 PBS(-)（100 μ l 左右）。
- ⑤ 将 PBS 从孔中弃掉。根据反应次数向所需量的 Lysis Solution 中添加 RNase Inhibitor 及 gDNA Remover。为了防止在加样过程中溶液损失，请参考下表，制备比所需量多一些的反应液。使用多通道移液器时，请按比所需量多出 10%的量制备反应液。

	1 个反应	10 个反应	96 个反应
Lysis Solution	58.7 μ l	587 μ l	5635.2 μ l
RNase Inhibitor	1 μ l	10 μ l	96 μ l
gDNA Remover	0.3 μ l	3 μ l	28.8 μ l

请在实验前制备⑥的混合液，并避免保存已添加 RNase Inhibitor 及 gDNA Remover 的 Lysis Solution。

- ⑥ 向各孔中加入 60 μ l Lysis Solution (含有 RNase Inhibitor 与 gDNA Remover)。

⑦ 请用 Plate Mixer, 在室温下振动 30 秒（强度要适当, 不要使培养基飞溅出来）。如果没有 plate mixer, 请用手背敲打 plate 的侧面, 使其轻轻地振动。直接于室温下孵育 4 分钟 30 秒。孵育时间可延长至 10 分钟。

⑧ 将细胞培养板置于冰上。

因为有些种类的细胞 RNase 的活性很强, 处理后仍有 RNase 活性的残留, 所以建议立即进行逆转录(RT)反应, 得到 cDNA。实验临时中断时, 请在 6 小时以内进行逆转录。

cDNA 可以长期保存。以细胞裂解液的形式保存时, 虽然-80℃可以冻存, 但是请在 2 个月以内进行逆转录反应。

(2) 96 孔板培养的悬浮细胞

为了避免裂解不完全, 当 1 个孔中的细胞数超过 7.5×10^4 时, 请将细胞培养液的一部分移到新的 96 孔板后再进行以下处理。

① 在培养板离心机上 2,000 rpm、离心 5 分钟。

② 除去培养基。

请用吸引器或移液器除去培养板中的培养基及 PBS。倾滤法或在滤纸上敲打会造成细胞的损失。

③ 添加 PBS(-) 100 μ l, 洗涤细胞（无需用移液器上下吹打）。

④ 2,000 rpm、离心 5 分钟。

⑤ 弃去 PBS, 进行(1) ⑥以后的操作。

(3) 用 96 孔板以外的容器培养的细胞

请参考下表调整试剂用量, 贴壁细胞请按(1), 悬浮细胞请按(2)进行操作。

	每孔中细胞数的标准	每孔使用的洗涤液 PBS(-)量	每孔使用的 Lysis Solution *1 量
384 孔板	4x10 ³ cells	100 μ l	16 μ l
48 孔板	2x10 ⁴ cells	250 μ l	120 μ l
24 孔板	4x10 ⁴ cells	500 μ l	240 μ l
12 孔板	8x10 ⁴ cells	1000 μ l	480 μ l
6 孔板	1x10 ⁵ cells	2000 μ l	960 μ l

*1: 表示的是 Lysis Solution 与 RNase Inhibitor 及 gDNA Remover 混合液的量。请参照(1)的⑥进行混合。

细胞回收、细胞计数后处理时请按以下操作进行。

- ① 计算细胞数，离心去除培养基。
- ② 用 PBS(-)洗涤细胞。
- ③ 最好将细胞的浓度控制在 1×10^7 cells/ml 以下，用 PBS(-)悬浮细胞。
- ④ 向各多孔板或微量管中分别注入 5 μ l，按(1) ⑥以下的步骤操作。

2. 逆转录(RT)反应

(使用 SuperPrep® II Cell Lysis & RT Kit for qPCR (Code: SCQ-401)时)

① 反应液的制备 (40 μ l 反应体系时)

参考下表，根据反应次数配制，在冰上制备需要量多一些的反应液。在充分混合和瞬时离心后向各 PCR 管或板中分别注入 32 μ l 该混合液。使用多通道移液器时，请按比所需量多出 10%的量制备反应液。

	1 个反应	10 个反应	96 个反应
5x RT Master Mix	8 μ l	80 μ l	768 μ l
Nuclease-free Water	24 μ l	240 μ l	2304 μ l

RT 反应中，虽然推荐向 20~40 μ l 的反应体系中添加 20%体积的裂解液（例如 40 μ l 的体系中含有 8 μ l 裂解液），但是细胞种类不同，更改为添加 15%体积（例如 40 μ l 时，裂解液 6 μ l）可提高定量性能。

制备 RT(-)样品时，请用 5xRT Master Mix no-RT Control 代替 5xRT Master Mix。试剂盒中附有可用 10 次（40 μ l 反应体系）的 no-RT Control 的试剂。

- ② 向分装后的 RT Master Mix 中加入 8 μ l 细胞裂解液，轻轻地混合之后，瞬时离心使混合液置于离心管的底部。
 - ③ 按以下温度进行温育。
 - 37°C、15 分钟*1
 - 50°C、5 分钟*2
 - 98°C、5 分钟
 - 4°C、保温
- *1: 必要时可延长至 60 分钟。
 *2: 本产品的逆转录酶，高温反应性能卓越。进行本步骤有时可提高逆转录效率。根据需要本步骤也可省略。
- ④ 反应结束后，产物可保存在 4°C 或 -20°C。4°C 可保存一周左右、-20°C 可长期保存。

[5] 荧光定量 PCR(例)

在进行 Realtime PCR 时，请参考所使用试剂及仪器的使用说明书。通常，按 10~15% 体积的标准添加 cDNA，就可以得到再现性很高的 Realtime PCR。由于使用的 Realtime PCR 试剂不同，有时模板的最适量也会不同，推荐先进行预实验。以下以本公司的试剂为例进行介绍。

1. 使用 THUNDERBIRD® Probe qPCR Mix (Code: QPS-101)

详细信息请参考 THUNDERBIRD® Probe qPCR Mix 的使用说明书。

(1) 反应液的制备

下面是使用 TaqMan® Probe 法进行荧光定量 PCR，50 μ l 及 20 μ l 反应体系的实验例。请根据所使用的 Realtime PCR 仪器的特性，适当增减反应液的数量。

	20 μ l 反应	50 μ l 反应	终浓度
灭菌水	X μ l	X μ l	
THUNDERBIRD® Probe qPCR Mix	10 μ l	25 μ l	1x
Forward Primer	6pmol	15pmol	0.3 μ M
Reverse Primer	6pmol	15pmol	0.3 μ M
TaqMan® Probe	4pmol	10pmol	0.2 μ M
50x ROX reference dye	0.4 or 0.04 μ l	1 or 0.1 μ l	1x / 0.1x*1
cDNA 溶液 ([4].2.④) *2	~3 μ l	~7.5 μ l	

*1: Applied Biosystems 公司的仪器、Agilent Technologies 公司的仪器等，为了校正孔间荧光强度及分装误差，使用 passive reference。使用这些仪器进行反应时，请添加试剂盒中附带的 ROX reference dye。最适添加量因仪器型号不同而异。主要仪器的添加量如下所示。另外，不需要校正的仪器则无需添加。

*2: Realtime PCR 反应液中添加的 cDNA 溶液体积请保持在总体积的 15% 以内。

表 1. 主要仪器的最适 ROX reference dye 浓度

仪器	终浓度(添加量)
Applied Biosystems 7000、7300、7700、7900HT、StepOne™、StepOnePlus™ 等	1 \times (1/50 倍)
Applied Biosystems 7500、7500Fast、Agilent Technologies 公司的仪器(option)等	0.1 \times (1/500 倍)
Roche、Bio-Rad、QIAGEN、TaKaRa 公司的仪器等	不需要

(2) PCR 循环条件设定 (例)

步骤	温度	时间	升降速度
预变性	95°C	60 秒*1	最大
PCR 变性 (40 cycles)	95°C	15 秒*2	最大
延伸	60°C	60 秒	最大

(Data Collection 设在延伸步骤)

*1: 本产品采用了高速热启动体系，通过极短的预变性时间，即可将酶重新活化。但是，为了使模板 DNA 充分变性，请根据各仪器的特性设定足够的预变性时间。当最适的预变性时间不确定时，请设定为 60 秒 (预变性时间的延长几乎对反应效率没有影响)。

*2: PCR 循环中的变性时间，请根据仪器的特性，按以下时间设定。请注意，变性不充分将会导致 PCR 效率低下。当最适的变性时间不确定时，请设定为 15 秒 (变性时间的延长几乎对反应效率没有影响)。

表 2. 主要仪器最适预变性时间的标准

仪器	预变性时间
Applied Biosystems 公司的高速循环仪 (Applied Biosystems 7500Fast 等)	20 秒
毛细管型高速循环仪 (Roche LightCycler™ 1.x、2.0)	30 秒
一般的模块型循环仪 (Applied Biosystems 7700、7500、7900HT(普通模块)、 StepOne™、StepOnePlus™、Bio-Rad CFX、 QIAGEN Rotor-Gene、Agilent Technologies、TaKaRa 公 司的仪器等)	60 秒

表 3. 主要仪器最适 PCR 循环中变性时间的标准

仪器	PCR 循环中的变性时间
Applied Biosystems 公司的高速循环仪 (Applied Biosystems 7500Fast 等)	3 秒
毛细管型高速循环仪 (Roche LightCycler™ 1.x、2.0)	5 秒
一般的模块型循环仪 (Applied Biosystems 7700、7500、7900HT(普通模块)、 StepOne™、StepOnePlus™、Bio-Rad CFX、 QIAGEN Rotor-Gene、Agilent Technologies 公司的仪器、 TaKaRa 公司的仪器等)	15 秒

2. 使用 KOD SYBR® qPCR Mix (Code: QKD-201)时

本试剂使用 KOD DNA polymerase 可表现出卓越的合成性能，另外不易受粗样品成分的抑制，比一般的 qPCR 试剂检测灵敏度更高。详细信息请参考 KOD SYBR® qPCR Mix 的使用说明书。

(1) 反应液的制备

以下是 50 μ l 及 20 μ l 反应时的制备例。请根据所使用的荧光定量 PCR 仪器特性，适当增加或减少反应液的用量。

	20 μ l 反应	50 μ l 反应	终浓度
灭菌水	X μ l	X μ l	
KOD SYBR® qPCR Mix	10 μ l	25 μ l	1x
Forward Primer	4pmol	10pmol	0.2 μ M
Reverse Primer	4pmol	10pmol	0.2 μ M
50x ROX reference dye	0.4 or 0.04 μ l	1 or 0.1 μ l	1x / 0.1x ^{*1}
cDNA 溶液 ([4].2.④) ^{*2}	~3 μ l	~7.5 μ l	

*1: Applied Biosystems 公司的仪器、Agilent Technologies 公司的仪器等，为了校正孔间荧光强度及分装误差，使用 passive reference。使用这些仪器进行反应时，请添加试剂盒中附带的 ROX reference dye。最适添加量因仪器型号不同而异。主要仪器的添加量如下所示。另外，不需要校正的仪器则无需添加。

*2: Realtime PCR 反应液中添加的 cDNA 原液量请保持在总体积的 15% 以内。

表 1. 主要仪器的最适 ROX reference dye 浓度

仪器	终浓度(添加量)
Applied Biosystems 7000、7300、7700、7900HT、 StepOne™、 StepOnePlus™ 等	1 \times (1/50 倍)
Applied Biosystems 7500、7500Fast、 Agilent Technologies 公司的仪器(option)等	0.1 \times (1/500 倍)
Roche、Bio-Rad、QIAGEN、 TaKaRa 公司的仪器等	不需要

(2) PCR 循环条件设定 (例)

KOD SYBR® qPCR Mix 的说明书中以 3 步法的 protocol 为标准，与本试剂组合使用时推荐用 2 步法 protocol 进行。

步骤	温度	时间	升降速度
预变性	95°C	60 秒 ^{*1}	最大
PCR 变性 (40 cycles)	95°C	15 秒 ^{*2}	最大
延伸 (Data Collection 请设定在延伸这一步)	60°C	60 秒	最大

融解曲线分析 (Melting / Dissociation Curve Analysis)^{*3}

*1: 本产品采用了高速热启动体系，通过极短的预变性时间，即可将酶重新活化。但是，为了使模板 DNA 充分变性，请根据各仪器的特性设定足够的预变性时间。当最适的预变性时间不确定时，请设定为 60 秒 (预变性时间的延长几乎对反应效率没有影响)。

*2: PCR 循环中的变性时间, 请根据仪器的特性, 按以下时间设定。请注意, 变性不充分将会导致 PCR 效率低下。当最适的变性时间不确定时, 请设定为 15 秒 (变性时间的延长几乎对反应效率没有影响)。

*3: 融解曲线分析的设定, 请根据各仪器的标准设定。详细信息请参考各仪器的使用说明书。

表 2. 主要仪器最适预变性时间的标准

仪器	预变性时间
Applied Biosystems 公司的高速循环仪 (Applied Biosystems 7500Fast 等)	20 秒
毛细管型高速循环仪 (Roche LightCycler™ 1.x、2.0)	30 秒
一般的模块型循环仪 (Applied Biosystems 7700、7500、7900HT(普通模块)、 StepOne™、StepOnePlus™、Bio-Rad CFX、 QIAGEN Rotor-Gene、Agilent Technologies 公司的仪器、 TaKaRa 公司的仪器等)	60 秒

表 3. 主要仪器最适 PCR 循环中变性时间的标准

仪器	PCR 循环中的变性时间
Applied Biosystems 公司的高速循环仪 (Applied Biosystems 7500Fast 等)	3 秒
毛细管型高速循环仪 (Roche LightCycler™ 1.x、2.0)	5 秒
一般的模块型循环仪 (Applied Biosystems 7700、7500、7900HT(普通模块)、 StepOne™、StepOnePlus™、Bio-Rad CFX、 QIAGEN Rotor-Gene、Agilent Technologies 公司的仪器、 TaKaRa 公司的仪器等))	15 秒

3. 使用 THUNDERBIRD® SYBR® qPCR Mix (Code: QPS-201)时

详细信息请参考 THUNDERBIRD® SYBR® qPCR Mix 的使用说明书。

(1) 反应液的制备

以下是 50µl 及 20µl 反应时的制备例。请根据所使用的荧光定量 PCR 仪器特性, 适当增加或减少反应液的用量。

	20µl 反应	50µl 反应	终浓度
灭菌水	Xµl	Xµl	
THUNDERBIRD® SYBR® qPCR Mix	10µl	25µl	1x

Forward Primer	6pmol	15pmol	0.3μM
Reverse Primer	6pmol	15pmol	0.3μM
50x ROX reference dye	0.4 or 0.04μl	1 or 0.1μl	1x / 0.1x*1
Cdna 溶液 ([4].2.④) *2	~2μl	~5μl	

*1: 请参考 2 (1) 表 1。

*2: Realtime PCR 反应液中添加的 cDNA 原液量请保持在总体积的 10%以内。

(2) PCR 循环条件的设定

请参考 2. (2)。

4. 使用其他公司的 qPCR 试剂时

使用 SuperPrep® II Cell Lysis & RT Kit for qPCR (Code: SCQ-401)制备的 cDNA, 请以 qPCR 反应体系的 10~15%体积标准使用。使用本试剂盒的逆转录反应试剂以外的试剂合成时, 请根据所使用的试剂的说明书添加 cDNA 的量及 qPCR 反应体系。

使用化学修饰的热启动 qPCR 试剂时, 本产品的 RT 反应液的最大添加量, 请以 10%为标准。根据所用 qPCR 试剂的性质不同, 该值有可能会下降。请减少逆转录反应液的添加量。

5. 使用 1-step RT-qPCR 试剂时

可以用本试剂制备的细胞裂解液作为 1-step RT-qPCR 的模板进行简易的测定。作为 1-step RT-qPCR 的试剂, 请使用本公司的 RNA-direct™ Realtime PCR Master Mix (Code: QRT-101)、THUNDERBIRD® Probe One-step qRT-PCR Kit (Code: QRZ-101)、RNA-direct™ SYBR® Green Realtime PCR Master Mix (Code: QRT-201)。详细信息请参考各产品附带的说明书。

A. 使用 RNA-direct™ Realtime PCR Master Mix (Code: QRT-101)

(1) 反应液的制备

以下是 50μl 及 20μl 反应时的制备例。请根据所使用的荧光定量 PCR 仪器特性, 适当增加或减少反应液的用量。

	20μl 反应	50μl 反应	终浓度
灭菌水 (RNase-free grade)	Xμl	Xμl	
RNA-direct™ Realtime PCR Master Mix	10μl	25μl	1x
50mM Mn(OAc) ₂	1μl	2.5μl	2.5 mM
Forward Primer	6pmol	15pmol	0.3μM

Reverse Primer	6pmol	15pmol	0.3μM
TaqMan® Probe	4pmol	10pmol	0.2μM
细胞裂解液 ([4].1.(1)⑨)	1~2μl	2.5~5μl	

(2) PCR 循环条件的设定

步骤	温度	时间	升降速度
预变性	90°C	30 秒	最大
逆转录反应	55°C	20 秒	最大
变性	95°C	60 秒	最大
PCR 变性 (40 cycles)	95°C	15 秒	最大
延伸	60°C	60 秒	最大

(Data Collection 请设定在延伸这一步)

B. 使用 THUNDERBIRD® Probe One-step qRT-PCR Kit (Code: QRZ-101)时

(1) 反应液的制备

以下是 50μl 及 20μl 反应时的制备例。请根据所使用的荧光定量 PCR 仪器特性，适当增加或减少反应液的用量。

试剂	20μl 反应	50μl 反应	终浓度
RNase free water	Xμl	Xμl	
2×Reaction Buffer	10μl	25μl	1×
DNA Polymerase	0.5μl	1.25μl	
RT Enzyme Mix	0.5μl	1.25μl	
Forward Primer	10pmol	25pmol	0.5μM
Reverse Primer	10pmol	25pmol	0.5μM
TaqMan® probe	4pmol	10pmol	0.2μM
50×ROX Reference dye	0.4 / 0.04μl*1	1 / 0.1μl*1	1× / 0.1×*1
(Uracil-N-Glycosylase)	0.4unit*2	1unit*2	
细胞裂解液 ([4].1.(1)⑨)	1~2μl	2.5~5μl	

*1: Applied Biosystems 公司的仪器、Agilent Technologies 公司的仪器等，为了校正孔间荧光强度及分装误差，使用 passive reference。使用这些仪器进行反应时，请添加试剂盒中附带的 ROX

reference dye。最适添加量因仪器型号不同而异。主要仪器的添加量如表 1 所示。另外，不需要校正的仪器则无需添加。。

*2: 使用 Uracil-N-Glycosylase(UNG)处理时, 请使用热敏感性(heat-labile)UNG。可根据各公司的推荐条件, 调整酶的用量。

表 1: 主要仪器的最适 ROX Reference dye 浓度

仪器	终浓度 (添加量)
Applied Biosystems®7000、7300、7700、7900HT、StepOne™、StepOnePlus™ 等	1×(1/50 倍)
Applied Biosystems®7500、7500Fast、Agilent Technologies (option) 等公司生产的仪器	0.1×(1/500 倍)
Roche、Bio-Rad、Qiagen 及 TaKaRa 等公司生产的仪器	不需要

(2) PCR 循环条件的设定

步骤	温度	时间	升降速度
(UNG 反应)	(25~25°C *1)	(10 分*1)	最大
逆转录反应	50°C	10 分	
预变性	95°C	60 秒	最大
PCR 变性	95°C	15 秒	最大
(40~45 cycles) *2			
延伸	60°C	45 秒	最大

(Data Collection 请设定在延伸这一步)

*1: 使用 UNG 处理时, 在逆转录反应前, 请设置 UNG 反应步骤。虽然上表中给出了通常的温度条件及反应时间, 请根据各公司的推荐条件进行调整。

*2: 用 40 个循环进行反应时, 如果扩增不充分, 请增加至 45 个循环。

C. 使用 RNA-direct™ SYBR® Green Realtime PCR Master Mix(Code: QRT-201)时

(1) 反应液的制备

以下是 50μl 及 20μl 反应时的制备例。请根据所使用的荧光定量 PCR 仪器特性, 适当增加或减少反应液的用量。

	20μl 反应	50μl 反应	终浓度
灭菌水 (RNase-free grade)	Xμl	Xμl	

RNA-direct™ SYBR® Green Realtime PCR Master Mix	10µl	25µl	1x
50mM Mn(OAc) ₂	1µl	2.5µl	2.5 mM
Forward Primer	4pmol	10pmol	0.2µM
Reverse Primer	4pmol	10pmol	0.2µM
细胞裂解液 ([4].1.(1)⑨)	1~2µl	2.5~5µl	

(2) PCR 循环条件的设定

步骤	温度	时间	升降速度	
预变性	95°C	30 秒	最大	
逆转录反应	55°C	20 分	最大	
变性	95°C	60 秒	最大	
PCR (40 cycles)	变性	95°C	15 秒	最大
	退火	55°C	15 秒	最大
延伸	74°C	60 秒	最大	

(Data Collection 请设定在延伸这一步)

融解曲线分析 (Melting / Dissociation Curve Analysis)*3

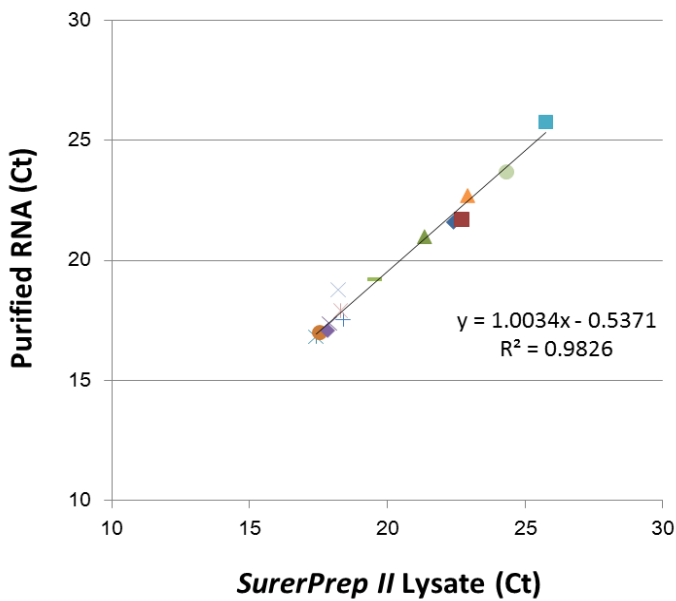
[6] 实验例

1 与纯化后的 RNA 检测结果的比较

<方法>

使用 SuperPrep® II Cell Lysis & RT Kit for qPCR (Code: SCQ-401), 对 2.5x10⁴ 个 HUVEC (人脐带静脉内皮细胞) 细胞进行处理得到细胞裂解液后, 进行 cDNA 的合成 (40 µl 反应体系)。另外, 同时使用 ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix (Code: FSQ-201)对从 HUVEC 细胞提取的 66.6 ng 的 Total RNA 进行 cDNA 合成 (40 µl 反应体系)。分别以上述两个试剂得到的 cDNA 为模板, 用 THUNDERBIRD® SYBR® qPCR Mix (Code: QPS-201)试剂, 对 15 种管家基因进行 Realtime PCR 分析比较。

<结果>



结果表明：15 种目的基因中，试剂盒制备的 cDNA 与纯化的 RNA 制备的 cDNA 之间，存在很高的相关性。由此可见，使用本试剂盒，无需进行复杂的 RNA 纯化，就可以简便地通过 Realtime PCR 进行基因表达分析

2. 分析准确性的评价

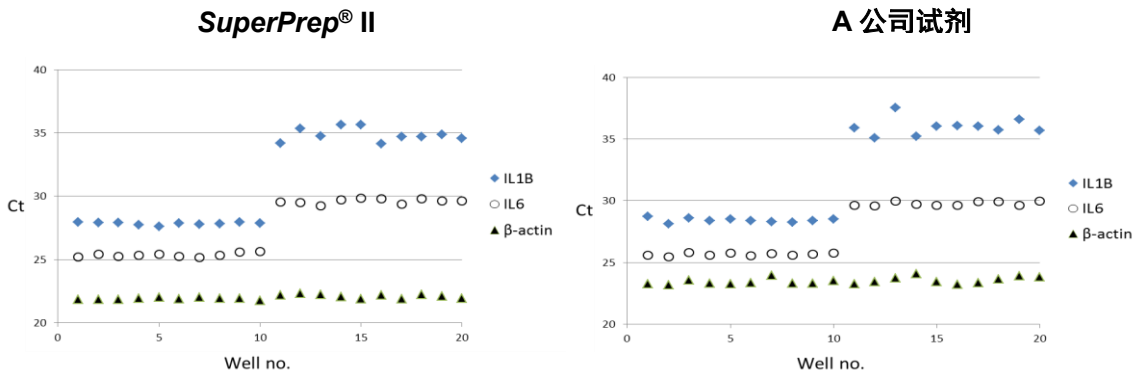
<方法>

将 HeLa S3 细胞铺板于 96 孔板中，每孔 2×10^4 个细胞，添加 100nM phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)，培养 24 小时。然后，分别用 PBS(-)洗涤 PMA 处理过的 12 个孔及未处理过的 12 个孔中的细胞，用 SuperPrep® II Cell Lysis & RT Kit for qPCR (Code: SCQ-401)处理后，进行 cDNA 的合成。以得到的 cDNA 为模板，使用 THUNDERBIRD® Probe qPCR Mix (Code: QPS-101)，对 IL-6、IL-1 β 、 β -actin 基因的表达量进行 Realtime PCR 分析。同样使用 A 公司的细胞处理试剂进行 Realtime PCR 分析。IL-6、IL-1 β 基因的 Ct 值用 β -actin 基因进行校正 (Δ Ct)、计算出有无 PMA 处理的差值 ($\Delta \Delta$ Ct)。接着计算 Z' -factor，进行比较。

Note: Z' -factor：是将数据的误差考虑在内的、高通量分析体系中质量标准的数值。一般认为在 0.5 以上是良好的结果。这里使用以下公司计算得到。

$$Z' \text{-factor} = 1 - 3 \times \frac{[\Delta \text{Ct}(+) \text{ 标准偏差} + \Delta \text{Ct}(-) \text{ 标准偏差}]}{|\Delta \Delta \text{Ct}|}$$

<结果>



IL-1 β	PMA	Ct(IL-1β)	ΔCt(IL-1β-β-actin)		ΔΔCt	Z'
		平均	平均	标准偏差		
SuperPrep® II	(+)	27.83	5.93	0.18	-6.81	0.66
	(-)	34.85	12.75	0.59		
A 公司试剂	(+)	28.42	5.01	0.28	-7.38	0.59
	(-)	35.98	12.39	0.74		

IL-6	PMA	Ct(IL-6)	ΔCt(IL-6-β-actin)		ΔΔCt	Z'
		平均	平均	标准偏差		
SuperPrep® II	(+)	25.35	3.45	0.20	-4.05	0.66
	(-)	29.60	7.50	0.26		
A 公司试剂	(+)	25.64	2.24	0.19	-3.94	0.64
	(-)	29.76	6.18	0.29		

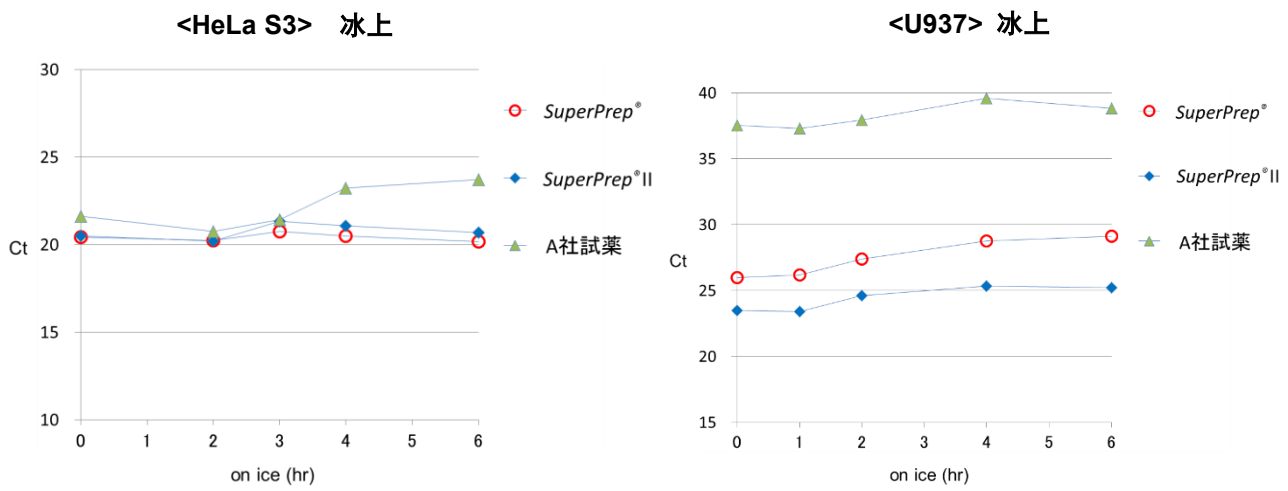
结果表明：虽然两种试剂得到的 Z' -factor 都超过了良好分析体系的标准 0.5，但是使用本公司的 SuperPrep® II Cell Lysis & RT Kit for qPCR (Code: SCQ-401) と THUNDERBIRD® Probe qPCR Mix (Code: QPS-101)试剂时，比其他公司的试剂得到了更高的 Z' -factor，可见是相对质量更高的分析体系。

3. 细胞裂解液在冰上稳定性的确认

<方法>

使用 SuperPrep® II Cell Lysis & RT Kit for qPCR (Code: SCQ-401), 分别从 4x10⁴ 个 HeLa S3 及 U937 细胞制备细胞裂解液, 将样品移至冰上以后, 分别取放置 0~6 小时后的细胞裂解液样品进行 cDNA 的合成。同样使用 A 公司试剂制备细胞裂解液, 同样方法取样, 进行 cDNA 的合成。以得到的 cDNA 为模板, 使用 THUNDERBIRD® Probe qPCR Mix (Code: QPS-101), 对 GAPDH 基因的表达量进行 Realtime PCR 分析。

<结果>



HeLa S3 细胞时及 RNase 活性较强的 U937 细胞, 在冰上放置 6 小时, 未见到 Ct 值有显著的差异。

*细胞的种类及处理细胞的数量较多时, 定量 PCR 的结果有可能受到较强的 RNase 活性的影响。细胞裂解液制备后, 建议迅速将样品置于冰上或 4℃ 进行 cDNA 的合成。另外, 根据需要, 推荐对使用的细胞进行预实验。

[7] Trouble Shooting

现象	原因	对策
Realtime PCR 中没检测到信号，或检测延迟	细胞数过多	<ul style="list-style-type: none"> · 过多的细胞来源的组分，有时会抑制 RT 反应或 qPCR 反应。请减少铺板的细胞数，或将裂解液用 Lysis Solution 稀释后，再添加到 RT 反应中。
	RNA 发生降解	<ul style="list-style-type: none"> · 因细胞的种类不同，有时 RNase 的活性会较强，裂解液中的 RNase 不能完全失活。遇到这种细胞时，推荐细胞裂解后，将裂解液移至冰上，立刻进行 RT 反应，转化为 cDNA。一般细胞株的裂解液在冰上放置 6 小时左右是稳定的。 · 保存裂解液时，请冻存于 -80℃ 并尽量减少冻融次数。 · 请使用新制备的细胞。要冻结保存分析用的细胞时，培养后，请用 PBS(-) 进行洗涤，将 PBS(-) 从细胞中弃去，于 -80℃ 冻结。
	逆转录反应液添加过多	<ul style="list-style-type: none"> · 虽然用本产品得到的 RT 反应液，即使以最大 15% 的比例添加到 qPCR 反应液中，也可以确认对线性没有影响，但根据所用 qPCR 试剂的性质不同，这个允许量有可能下降。请减少逆转录反应液的添加量。使用 THUNDERBIRD® SYBR® qPCR Mix (Code: QPS-201) 时，RT 反应液向 qPCR 反应液中添加的最大量请按 10% 添加。 · 使用本产品以外的 RT 试剂时，带入 qPCR 反应的允许量有可能发生变化。请先进行预实验。
定量性能低	细胞裂解时没有混合均匀	<ul style="list-style-type: none"> · 添加 Lysis Solution、Stop Solution 后，请充分混合，不要产生搅拌不均匀。

[8] 相关产品

产品名称	容量	Code No.
------	----	----------

Realtime PCR 用细胞裂解&Cdna 合成试剂盒（培养细胞用） SuperPrep® Cell Lysis & RT Kit for qPCR	100 次反应	SCQ-101
Realtime PCR 用细胞裂解液（培养细胞用） SuperPrep® Cell Lysis Kit for qPCR	100 次反应	SCQ-201
各种荧光探针·荧光引物检测用 Realtime PCR 试剂 THUNDERBIRD® Probe qPCR Mix	1mlx1 (40 次份)	QPS-101T
	1.67mlx3 (200 次份)	QPS-101
	1.67mlx15 (1000 次份)	QPS-101X5
高效率 SYBR® Green I 检测用 Realtime PCR 试剂 KOD SYBR® qPCR Mix	1mlx1 (40 次份)	QKD-201T
	1.67mlx3 (200 次份)	QKD-201
	1.67mlx15 (1000 次份)	QKD-201X5
高效率 SYBR® Green I 检测用 Realtime PCR 试剂 THUNDERBIRD® SYBR® qPCR Mix	1mlx1 (40 次份)	QPS-201T
	1.67mlx3 (200 次份)	QPS-201
	1.67mlx15 (1000 次份)	QPS-201X5
高效率 One-step qRT-PCR Kit THUNDERBIRD® Probe One-step qRT-PCR Kit	100 次份	QRZ-101
One step qRT-PCR kit（TaqMan®分析·探针分析用） RNA-direct™ Realtime PCR Master Mix	0.5mlx5 (100 次份)	QRT-101
	0.5mlx25 (500 次份)	QRT-101X5
One step qRT-PCR kit（SYBR® Green I 分析用） RNA-direct™ SYBR® Green Realtime PCR Master Mix	0.5mlx5 (100 次份)	QRT-201
	0.5mlx25 (500 次份)	QRT-201X5

欲知更多详情，请关注东洋纺官方网站！

◆东洋纺（上海）生物科技有限公司网址◆

www.bio-toyobo.cn



东洋纺（上海）生物科技有限公司



[销售商]

东洋纺（上海）生物科技有限公司

地址：上海市浦东新区张杨路 500 号华润时代广场 28 楼 AL

邮编：200122

订购 • 技术相关咨询

Tel:021-5879-4900 Fax:021-5879-4901

E-Mail:tech@bio-toyobo.cn

<http://www.bio-toyobo.cn>

[生产商]

东洋纺株式会社敦贺生物工厂

地址：日本国福井县敦贺市东洋町 10 番 24 号