

RNAflash DCA (Direct Cellular Amplification)

two steps RT qPCR (probe) kit

货号：500-106

1. 产品保存：

-15℃至-25℃保存一年，干冰运输。

2. 产品简介：

RNAflash DCA (Direct Cellular Amplification) two steps RT qPCR (probe) kit 是一款快速、高效地从“细胞”直接到“扩增结果”的全套试剂盒，适用于 $10 - 10^5$ 个培养细胞的基因表达分析。本产品无需传统提取繁琐的流程，可在细胞培养板中直接完成基因组 DNA 清除和 RNA 获取；搭配高效率、高稳定性、高特异性的逆转录试剂和探针法 qPCR 试剂，快至 82 min 即可从细胞中得到基因表达结果。本试剂盒操作便捷，可兼容广泛的细胞类型(贴壁和悬浮细胞)及细胞量，在提高效率的同时减少纯化过程中的样品损失，也可解决传统提取方式中低细胞数提取效果不佳的问题。本试剂盒可用于高通量(96/384 孔板)细胞 RNA 的表达分析。

3. 产品特点：

- 普适性：多种细胞类型的基因表达分析，从 10 个到 10^5 个常规培养细胞或稀有细胞，均可实现有效检测；
- 免纯化工艺：简化传统 RNA 提取流程，在培养孔内 5 分钟完成细胞裂解，7 分钟内完成 gDNA 消化，避免纯化造成的 RNA 损失；
- 高通量兼容：满足大规模细胞样本的平行处理需求，显著降低了高通量检测过程中的时间成本以及操作误差；
- 高效率：优化的逆转录体系兼容裂解体系，qPCR 体系可对生成的 cDNA 精准检测，最快检测仅需 50min。

4. 产品组成：

货号	组分	规格 (100T/20 μ L)	说明	储存条件
500-106-1	Lyse™ Buffer ^(a)	250 μ L/支	裂解缓冲液	融解置于 2-8℃
500-106-2	Purge™ Enzyme	100 μ L/支	基因组去除酶	-20℃
500-106-3	StopXtract™ Buffer ^(b)	250 μ L/支	终止缓冲液	分装置于 -20℃
500-106-4	DCA RT Enzyme Mix ^(c)	175 μ L/支	酶混合液	-20℃
500-106-5	DCA RT buffer Mix ^(c)	325 μ L/支	缓冲液混合液	-20℃
500-106-6	DCA qPCR probe Mix ^(d)	1000 μ L/支	定量混合液	-20℃

a. Lyse™ Buffer 解冻后可于 2 ~ 8℃ 条件下稳定存放 1 年。

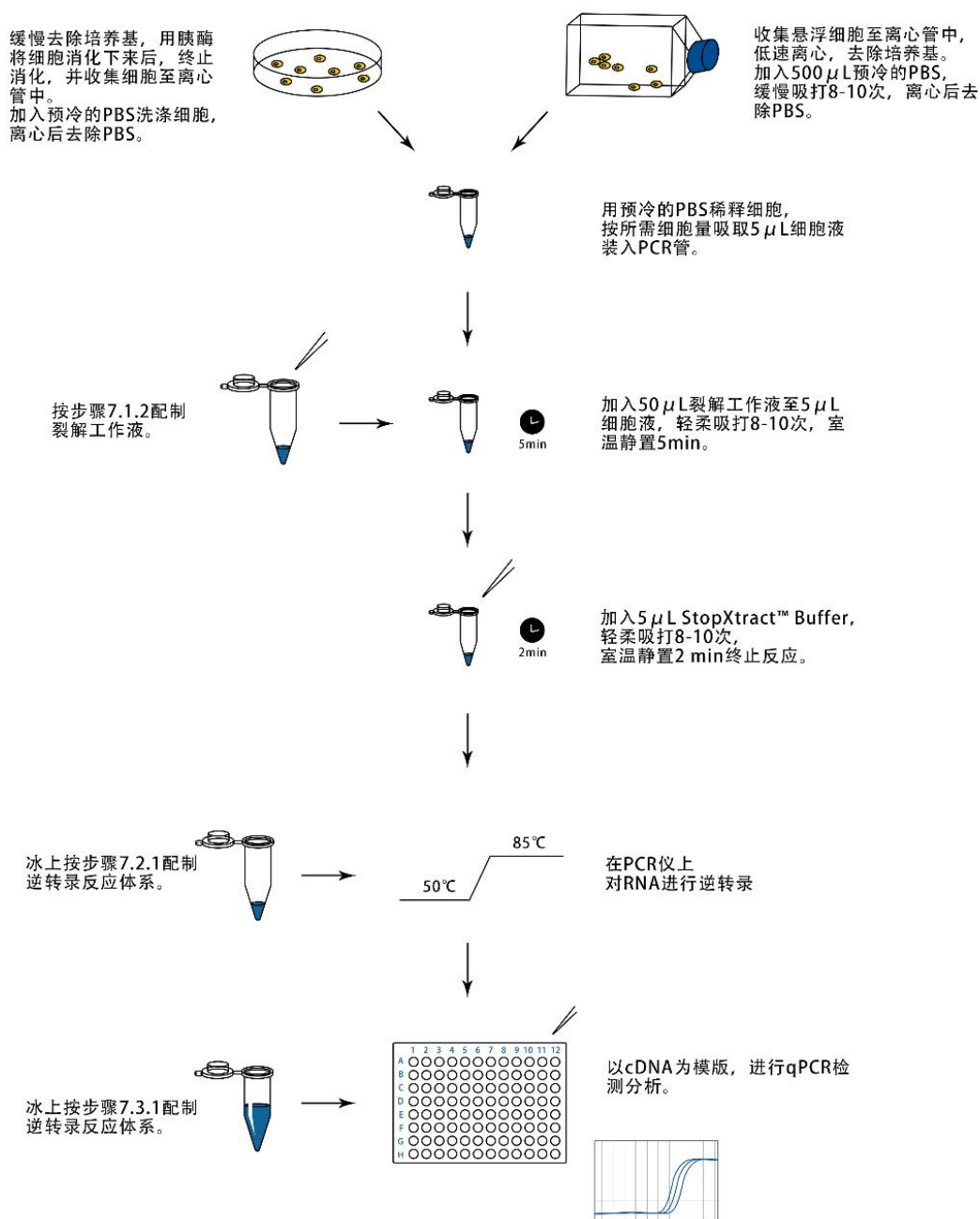
b. StopXtract™ Buffer 应避免反复冻融，需分装后置于 -20℃。

- c. DCA RT Mix含dNTP Mix, Mg^{2+} , 逆转录酶、oligo d(T)18, 随机引物和辅助因子等, 该组分需严格按照规定温度保存, 且逆转录时无需再添加特异性引物。
- d. DCA qPCR probe Mix中含有热启动Taq酶、UDG, dUNTPs等, 需按规定储存条件储存。

5. 自备材料和试剂

ROX 校正染料, $1 \times$ PBS 缓冲液、RNase-free ddH₂O、RNase-free 吸头、1.5 ml RNase-free 离心管、0.2 ml RNase-free 八联排/PCR 管等。

6. 实验工作流程图



7. 实验流程

7.1 RNA获取

7.1.1 样本处理与准备

● 贴壁细胞：

- (a) 洗涤细胞：将不同孔板的贴壁细胞轻轻去除细胞培养基后，贴壁缓慢加入对应量的胰酶，37℃培养箱消化3-5 min，并在显微镜下观察细胞形态。当细胞开始变圆、细胞间隙变大时，说明消化接近完成，随后加入适量的含血清培养基终止消化作用，轻轻吹打细胞，使细胞脱落并形成单细胞悬液，1000 rpm (930 × g)，4℃离心5 min，移除培养基后，等体积的预冷的1×PBS洗涤，1000 rpm (930 × g)，4℃离心5 min收集至管底，加入适量PBS（细胞数量测试的线性范围为10至10⁵个），置于冰上备用。

注意1：去除培养基或PBS时动作应尽量轻缓，避免在清洗过程中造成细胞损失。

注意2：若贴壁细胞为96孔或者384孔板培养，则去除培养基后直接用预冷PBS洗涤2-3次即可；若贴壁细胞使用其他容器培养，则需用胰蛋白酶将贴壁细胞从容器壁解离下来，并对胰蛋白酶失活处理，可加入适量的含血清的完全培养基中和胰蛋白酶，离心去除培养基后，预冷PBS连续洗涤细胞2-3次。

- (b) 稀释细胞：根据实验需求(细胞数量测试的线性范围为10至10⁵个)，用预冷的1×PBS稀释细胞，将稀释后的细胞悬液分装至200 μL PCR管中，每管5 μl (保持细胞数在10 - 10⁵个/管)，置于冰上备用。

● 悬浮细胞：

- (c) 去除培养基：将悬浮细胞转移至离心管中，1000 rpm (930 × g)，4℃离心5 min收集至管底，去除培养基。
- (d) 洗涤细胞：加入预冷的1×PBS (尽量保证细胞密度处于2 × 10⁴至2 × 10⁶个/mL, 500 μL中含10³个细胞至10⁵个细胞)，用移液器轻轻吸打8 - 10次，无明显细胞团即可；1000 rpm (930 × g)，4℃离心5 min收集至管底，去除PBS。
- (a) 稀释细胞：根据实验需求(细胞数量测试的线性范围为10至10⁵个)，用预冷的1×PBS稀释细胞，将稀释后的细胞悬液分装至200 μL PCR管中，每管5 μl (保持细胞数在10 - 10⁵个/管)，置于冰上备用。

注意：去除培养基或PBS时动作应尽量轻缓，避免在清洗过程中造成细胞损失。

7.1.2 RNA获取

- (a) 配制裂解工作液(200 μL PCR管)

组份	体积 (μL)
Lyse™ Buffer	48
Purge™ Enzyme	2

注意：裂解工作液按照孔板所需体积进行配制，各组分比例为Lyse™ Buffer : DNase I : Purge™ Enzyme = 24 : 1。配制完毕，颠倒混匀10 - 15次，避免剧烈涡旋振荡；混匀后置于冰上，请在1 h内使用。

- (b) 向含有细胞的96孔板中加入50 μL裂解工作液，移液器轻轻吸打8 - 10次充分混匀，室温静置5-7 min 裂解细胞。

(c) 加入5 μ L StopXtract™ Buffer，移液器轻轻吸打8 - 10次混匀，室温静置2 min终止反应。

注意：裂解产物可置于冰上保存2 h，若需长期保存需置于-80℃。

7.2 逆转录反应

7.2.1 配置反应体系

按下表 1 在冰上配制反应体系，使用 5 μ L RNase-Free/ Nuclease Free H₂O 作为无模板对照（NTC 组），每组设置 3 个重复。随后按照表 2 程序进行反应，即逆转录：50℃反应 20 min，酶失活：85℃反应 5 min。反应完的产物若立即使用则置于冰上保存，若间隔一段时间使用，则置于-20℃保存。

表 1 逆转录反应体系

试剂	单个反应体积(μ L) ⁽¹⁾	单个反应体积(μ L) ⁽¹⁾
DCA RT Enzyme Mix	1.75	3.5
DCA RT Buffer Mix	3.25	6.5
细胞裂解液 ⁽²⁾	X	X
RNase-Free/DNase-Free 水	Up to 10 μ L	Up to 20 μ L

注意：1. 将各组分置于冰上融解，轻微混匀离心后，加液顺序按照体系从多到少。

2. 一般 20 μ L 体系投入 4 μ L 细胞裂解液。可按照基因表达丰度自行调整，最多不超过 8 μ L，细胞裂解液投入体积尽量不要低于 1 μ L，避免吸液不准造成的误差

表 2 逆转录反应程序

步骤	循环数	反应温度	反应时间
逆转录 ⁽³⁾	1 cycle	50℃	20 min
变性		85℃	5 min

注意：3. 逆转录时间可根据模板的起始量或者基因丰度适度延长，最长反应时间不超过 30 min。

7.3 qPCR反应

7.3.1 配置反应体系

按下表 3 在冰上配制反应体系

表 3 DCA qPCR（probe）反应体系

试剂	单个反应体积(μ L) ⁽⁴⁾
DCA qPCR probe Mix	10
10 μ M 靶标上游引物 ^(5,6,7)	0.4
10 μ M 靶标下游引物 ^(5,6,7)	0.4
10 μ M 靶标探针 ⁽⁸⁾	0.2
cDNA 模板	X（参考步骤 7.3.2）
ROX 校正染料 ⁽⁹⁾	Y
RNase-Free/DNase-Free 水	Up to 20 μ L

注意：4. 将各组分置于冰上融解，轻微混匀离心后，加液顺序按照体系从多到少。

5. 一般来说反应体系中引物终浓度为 0.2 μM 即可得到较好的扩增效果。当反应性能比较差时，可以在 0.1 - 1.0 μM 范围内调整引物浓度。
6. 可根据检测需要，增加靶标个数。
7. 扩增产物长度请选择在 100 - 500 bp 范围内，尤其推荐 100 - 200 bp 之内。
8. 一般来说反应体系中探针终浓度为 0.1 μM 即可得到较好的扩增效果。当反应性能比较差时，可在 0.05 - 0.25 μM 范围内调整其浓度。
9. 若使用需要校正染料的 qPCR 仪，则按照注意事项中建议的浓度投入到体系。

7.3.2 模板投入

向实验组的 PCR 反应管中分别加入 2-4 μL 细胞裂解液，使用 5 μL RNase-Free/ Nuclease Free H_2O 作为无模板对照（NTC 组），每组设置 3 个重复。

注意：投入 2-8 μL 细胞裂解液，对扩增无抑制作用，细胞裂解液投入体积尽量不要低于 1 μL ，避免吸液不准造成的误差。

7.3.3 反应程序

将反应体系轻轻混匀，并短暂离心，随后运行表 2 程序。

表 2 DCA qPCR（probe）反应程序

步骤	循环数	反应温度	反应时间	收集信号
预变性	1 cycle	95°C	30 sec	否
变性	40 cycle	95°C	10 sec	否
延伸		60°C	30 sec	是

7.3.4 No RT Control 反应(可选)

No RT Control 是指不加逆转录酶的逆转录阴性对照反应，用于检验 RNA 模板中是否有基因组 DNA 残留。也可使用 DCA qPCR probe Mix（货号 500-106-6）进行检测。

注意事项:

- 1.按照注明的储存条件和要求对试剂储存，比如为避免StopXtract™ Buffer反复冻融，应对其分装后置于-20℃。
- 2.裂解细胞时，吹打时尽量轻柔，避免剧烈起泡。
3. DCA RT Enzyme Mix含有高浓度的甘油，使用前请短暂离心，收集到反应管底部，并用移液枪轻轻吸打，充分混匀后准确吸取。
4. 反应液的配制请使用RNase-free枪头，EP管等，尽量避免污染。
5. 本制品中未配有ROX Reference Dye，如果反应中需要添加ROX Reference Dye用以校正孔间荧光信号值误差，请根据仪器设备说明书要求确定是否添加ROX Reference Dye（一般需要高浓度ROX校正的仪器的ROX工作浓度为0.4 μM；需要低浓度ROX校正的工作浓度为0.08 μM ,仪器见表3），ROX Reference Dye 产品在反应体系中建议50X稀释使用（例如，50μl反应体系中添加1μl ROX Reference Dye），如果实验结果不理想，可调整ROX Reference Dye添加量。

	仪器
无需添加ROX	(Bio-Rad) IQ5, CFX96, CFX384, CFX Connect, MJOpticon, Opticon 2; (Cepheid) SmartCycler®System, Smart Cyclyer II System; (Roche) LightCycler®2.0, 480, 96; (Qiagen) Rotor-Gene Q, 3000, 6000; (Bioer) Line-Gene; (Eppendorf) Mastercycler ep realplex; (Analytik Jena) qTOWER3;
添加ROX (终浓度为0.4μM)	(Thermo) ABI7000, 7300, 7700, 7900, 7900HT, 7900HT Fast, StepOne, StepOnePlus
添加ROX (终浓度为0.08μM)	(Thermo) ABI 7500, 7500 Fast, ViiA7, QuantStudio 3 / 5, QuantStudio 6 / 7 / 12K Flex, QuantStudioTMDx; (Agilent) Mx3000P, Mx3005P, MX4000;