

Code No. 3733

研究用

---

**TAKARA**

CellAmp™ Direct Prep Kit for  
RT-PCR (Real Time)  
& Protein Analysis

---

说明书

# 目 录

内 容	页 码
● 制品说明	1
● 制品内容	1
● 保 存	1
● 试剂盒外必备主要试剂和仪器	1
● 使用注意	1
● 操作方法	2
● 附 录	3
● 实验例	9
● Troubleshooting	10
● 关联产品	11

## ● 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制备细胞裂解液的试剂盒。制备的细胞裂解液可直接使用 One Step 或 Two Step Real Time RT-PCR 法对 mRNA 表达量进行解析, 或使用 Western Blot 方法对蛋白质表达量进行解析。使用本试剂盒方便快捷, 操作简单, 可在 10 分钟内完成从培养细胞中制备样品, 不需要进行核酸精制和蛋白质提取, 可以直接作为 Real Time RT-PCR 反应的模板或者作为 Western Blot 实验用的样品。另外, 试剂盒中添加的 SDS-PAGE 用 Loading Buffer 中不含 2-ME, 可以在不含 2-ME 条件下进行 Western Blot 分析。

使用本试剂盒制备的细胞裂解液可与 One Step TB Green<sup>®</sup> PrimeScript™ RT-PCR Kit (Perfect Real Time) (Code No. RR086A/B) 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) 等组合使用, 可在 30 分钟内完成 cDNA 合成。本试剂盒可与大多数 Takara 的 Real Time RT-PCR 制品组合使用。

## ● 制品内容 (200 次量) \*

组分名称	包装量
CellAmp Washing Buffer	12.5 ml × 2
CellAmp Processing Buffer	10 ml
DNase I for Direct RNA Prep	200 μl
5X Loading Buffer	1 ml × 2
1 M DTT (Dithiothreitol)	100 μl × 2

\*使用 96 孔板时, 200 孔培养细胞的反应次数。

## ● 保 存: -20°C。

5X Loading Buffer: 开封后室温保存。

CellAmp Washing Buffer 及 CellAmp Processing Buffer 融解后可以在 4°C 保存。

请注意避免污染。

## ● 试剂盒外必备主要试剂和仪器

### 1. 试剂

Real Time RT-PCR 试剂盒 (表 1)

SDS-PAGE 和 Western Blot 分析用试剂

### 2. 仪器

SDS-PAGE 和 Western Blot 分析用仪器

## ● 使用注意

### 1. 本试剂盒应与表 1 中所列产品组合使用

表 1 可组合使用的 Real Time RT-PCR 产品

#### One-step Real Time RT-PCR

Code No.	产品名称
RR086A/B	One Step TB Green PrimeScript RT-PCR Kit II (Perfect Real Time)
RR066A/B	One Step TB Green PrimeScript RT-PCR Kit (Perfect Real Time)
RR064A/B	One Step PrimeScript RT-PCR Kit (Perfect Real Time)
RR096A/B	One Step TB Green PrimeScript PLUS RT-PCR Kit (Perfect Real Time)

## Two-step Real Time RT-PCR

Code No.	产品名称
RR037A/B	PrimeScript RT reagent Kit (Perfect Real Time)
RR036A/B	PrimeScript RT Master Mix (Perfect Real Time)
RR820A/B	TB Green <i>Premix Ex Taq</i> <sup>TM</sup> II (Tli RNaseH Plus)
RR420A/B	TB Green <i>Premix Ex Taq</i> ( Tli RNaseH Plus)
RR091A/B	TB Green Premix DimerEraser <sup>TM</sup> (Perfect Real Time)
RR390A/B	<i>Premix Ex Taq</i> (Probe qPCR)

- CellAmp Washing Buffer、CellAmp Processing Buffer 及 5X Loading Buffer 在融解过程中有析出物时，请于室温下完全融解后使用。
- 在细胞裂解液制备过程中要迅速进行，不要停滞。
- 试剂在分装时必须使用新的一次性枪头，连续取样时要更换枪头，不得在不同试剂中使用同一个枪头，尽量避免试剂污染。
- RNA 制备说明。
  - 尽量使用无菌、无 RNase 的一次性塑料器皿，如果不能确定是否除去 RNase，则应在使用前灭菌处理。如使用玻璃器皿，则需 160°C 干热灭菌至少 2 小时，或者用 0.1% 的 DEPC 处理水在 37°C 处理 12 小时，然后高压灭菌。
  - RNA 实验用的器具和仪器建议专门使用，不要用于其它实验。
  - 尽量使用 0.1% DEPC 处理过的水配制试剂，并且使用前需要灭菌。如果所用试剂不能灭菌，可以使用无菌的容器以及无菌水进行配制，在使用前过滤除菌。
  - 样品制备的过程中还需要其他的防污染措施，包括使用无菌的一次性手套以及口罩等，防止汗水及唾液造成的污染。

## ● 操作方法

### 1. 溶液的配制

· 按下列组分在冰上配制细胞 Processing 溶液（使用 96 孔板时的每个孔量\*）。

试 剂	使用量
CellAmp Processing Buffer	49 $\mu$ l
DNase I for Direct RNA Prep	1 $\mu$ l
Total	50 $\mu$ l

\*: 使用其它类型板时请参照“附录 3.”。

· 5X Loading Buffer 中加入 1 M DTT\*。

进行 Western Blot 实验时需要使用此 Buffer。使用前在微量离心管中分取适量的 5X Loading Buffer，再按每 100  $\mu$ l 的 5X Loading Buffer 中添加 10  $\mu$ l 的 1 M DTT 的比例加入 DTT。

\*: 每个样品中（细胞裂解液 10  $\mu$ l）加入 2.5  $\mu$ l 含有 DTT 的 Loading Buffer。

### 2. 96 孔板贴壁细胞裂解液的制备

注意：使用其它类型板时请参照“附录 3.”所建议的反应体积和细胞接种量。

- 向 96 孔板中接种  $1 \times 10^4 - 1 \times 10^5$  cells。
- 根据实验要求培养适量的细胞数。
- 用枪头尽量除尽培养基。
- 向各孔中添加 125  $\mu$ l 的 CellAmp Washing Buffer，再用枪头尽量吸尽 CellAmp Washing Buffer。
- 向各孔中添加 50  $\mu$ l 上述配制好的细胞 Processing 溶液，室温（15–28°C 左右）放置 5 min。
- 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°C 水浴 5 min。

- 7) 使用上述操作得到的细胞裂解液作为模板, 可进行 Real Time RT-PCR 实验。
  - ① 操作方法参见“附录 1.”(一步法)或“附录 2.”(两步法)。
  - ② 如果进行 25  $\mu\text{l}$  体系的一步法 Real Time RT-PCR 反应或者 10  $\mu\text{l}$  体系的反转录反应, 裂解液的用量应低于 2  $\mu\text{l}$ 。
  - ③ 裂解液的制备应于冰上操作, Real Time RT-PCR 反应应在制备裂解液 1 小时之内开始。裂解液可于 $-80^{\circ}\text{C}$ 保存 2 周。
- 8) 进行 Western Blot 实验时, 10  $\mu\text{l}$  的细胞裂解液中加入 2.5  $\mu\text{l}$  含有 DTT 的 Loading Buffer,  $95^{\circ}\text{C}$  5 min 热处理后进行 SDS-PAGE 及 Western Blot 分析。

### 3. $1 \times 10^4$ – $1 \times 10^5$ 悬浮细胞裂解液的制备

注意: 如果制备的裂解液高于  $1 \times 10^5$  cells, 可按比例增加试剂用量。

- 1) 计算细胞数, 将含有  $1 \times 10^4$ – $1 \times 10^5$  cells 的细胞培养液转移到适当容量的离心管中。
- 2) 300g, 离心 5 min。
- 3) 用枪头尽量除尽培养基。
- 4) 向各离心管中添加 125  $\mu\text{l}$  的 CellAmp Washing Buffer。
- 5) 300g, 离心 5 min。
- 6) 用枪头尽量除尽 CellAmp Washing Buffer。
- 7) 添加 50  $\mu\text{l}$  上述配制好的细胞 Processing 溶液, 室温 ( $15$ – $28^{\circ}\text{C}$ ) 放置 5 min。
- 8) 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,  $75^{\circ}\text{C}$  水浴 5 min。
- 9) 使用上述操作得到的细胞裂解液作为模板进行 Real Time RT-PCR 实验。
  - ① 操作方法参见“附录 1.”(一步法)或“附录 2.”(两步法)。
  - ② 如果进行 25  $\mu\text{l}$  体系的一步法 Real Time RT-PCR 反应或者 10  $\mu\text{l}$  体系的反转录反应, 裂解液的用量应低于 2  $\mu\text{l}$ 。
  - ③ 裂解液的制备应于冰上操作, Real Time RT-PCR 反应应在制备裂解液 1 小时之内开始。裂解液可于 $-80^{\circ}\text{C}$ 保存 2 周。
- 10) 进行 Western Blot 实验时, 10  $\mu\text{l}$  的细胞裂解液中加入 2.5  $\mu\text{l}$  含有 DTT 的 Loading Buffer,  $95^{\circ}\text{C}$  5 min 热处理后进行 SDS-PAGE 及 Western Blot 分析。

## ● 附 录

### 1. 使用 One Step TB Green PrimeScript RT-PCR Kit (Perfect Real Time) 在 Thermal Cycler Dice™ Real Time System // (终卖) 中进行一步法 Real Time RT-PCR 的实验例

- 1) 在冰上将 1~2  $\mu\text{l}$  的细胞裂解液分装到反应管或 96 孔反应板中。
- 2) 按下列组分在冰上配制 Master Mix。

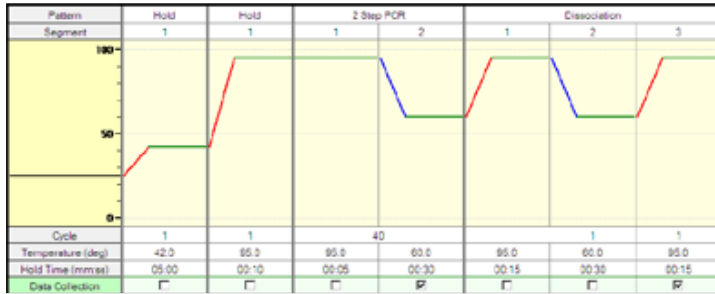
试剂	使用量*1	终浓度
2X One Step TB Green RT-PCR Buffer III	12.5 $\mu\text{l}$	1X
TaKaRa Ex Taq <sup>®</sup> HS (5 U/ $\mu\text{l}$ )	0.5 $\mu\text{l}$	
PrimeScript RT Enzyme Mix II	0.5 $\mu\text{l}$	
PCR Forward Primer (10 $\mu\text{M}$ )	0.5 $\mu\text{l}$	0.2 $\mu\text{M}$ *2
PCR Reverse Primer (10 $\mu\text{M}$ )	0.5 $\mu\text{l}$	0.2 $\mu\text{M}$ *2
RNase Free dH <sub>2</sub> O	8.5~9.5 $\mu\text{l}$	
Total	23~24 $\mu\text{l}$	

\*1: 单次反应的使用量

\*2: Primer 的最终浓度为 0.2  $\mu\text{M}$  时, 多数情况都能得到良好结果, 如果反应性能有问题, 请在 0.1~1.0  $\mu\text{M}$  范围内研讨最适浓度。

- 3) 向每份细胞裂解液中添加 Master Mix 后混匀, 经轻微离心后, 放置于 Thermal Cycler Dice Real

Time System // (终卖) 上开始反应。



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 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、定量准确度等都会受到影响。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。

2. 使用 PrimeScript RT reagent Kit (Perfect Real Time) 与 TB Green *Premix Ex Taq II* (Perfect Real Time) 在 Thermal Cycler Dice Real Time System // (终卖) 中进行两步法 Real Time RT-PCR 的实验例

【反转录反应: PrimeScript RT reagent Kit (Perfect Real Time)】

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

\* 配制 master mix 的量要稍大于实际反应总量, 以防止移液器加样损失。分装完毕后, 向每个离心管中加入 RNA 样品。

试剂	单次反应使用量	终浓度
5X PrimeScript Buffer (for Real Time)	2 $\mu$ l	1X
PrimeScript RT Enzyme Mix I	0.5 $\mu$ l	
Oligo dT Primer (50 $\mu$ M)	0.5 $\mu$ l	25 pmol
Random 6 mers (100 $\mu$ M)	0.5 $\mu$ l	50 pmol
RNase Free dH <sub>2</sub> O	4.5~5.5 $\mu$ l	
Total	8~9 $\mu$ l	

注意: ① 可根据需要扩大反转录反应的体积。

② Random 6 mers 和 Oligo dT Primer 同时使用, 可有效地将全长 mRNA 反转录成 cDNA。

③ 使用单引物进行反转录时, 使用量分别如下:

Random 6 mers (100  $\mu$ M) 0.5  $\mu$ l (50 pmol)

Oligo dT Primer (50  $\mu$ M) 0.5  $\mu$ l (25 pmol)

Specific Primer (2  $\mu$ M) 0.5  $\mu$ l (1 pmol)

2) 向反转录反应 Master Mix 的反应管中添加 1~2  $\mu$ l 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°C 15 min (反转录反应)

85°C 5 sec (反转录酶热失活)

4°C

注意 ① 10  $\mu$ l 的反转录反应中应添加2  $\mu$ l 以下的细胞裂解液。

② 使用Gene Specific Primer时, 反转录反应条件请使用42°C 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°C对提高PCR反应特异性会有所改善。

③ 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。

【Real Time PCR反应】

1) 将2  $\mu$ l 的反转录反应液分装到反应管或96孔反应板中, 冰上放置。

2) 按下列组分在冰上配制Master Mix。

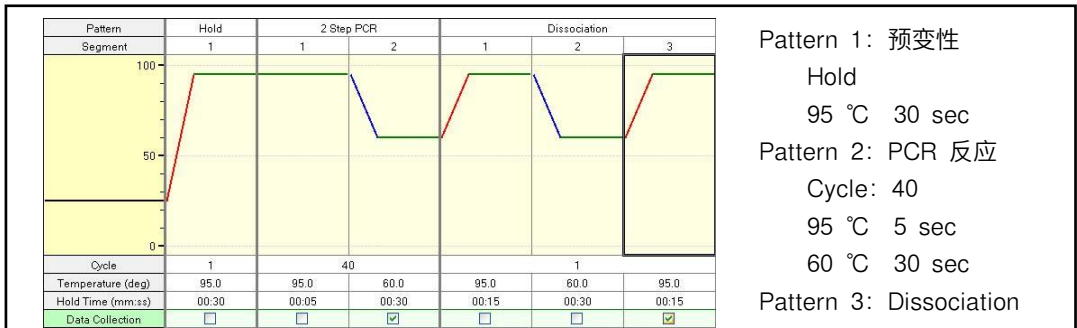
试剂	单次反应使用量	终浓度
TB Green Premix Ex Taq II (2X)	12.5 $\mu$ l	1X
PCR Forward Primer (10 $\mu$ M)	1 $\mu$ l	0.4 $\mu$ M
PCR Reverse Primer (10 $\mu$ M)	1 $\mu$ l	0.4 $\mu$ M
灭菌水	8.5 $\mu$ l	
Total	23 $\mu$ l	

\* Primer 的最终浓度为 0.4  $\mu$ M 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  $\mu$ M 范围内研讨最适浓度。

3) 向分装好的反转录反应液中加入 Master Mix 后混匀, 经轻微离心后放置于 Thermal Cycler Dice Real Time System II (终卖) 上开始反应。

注意: ① 请先按照下述标准流程进行 Real Time PCR 反应, Tm 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。

② 使用 TB Green Premix Ex Taq II 时, PCR 预变性条件可以设定为 95°C 30 秒钟。加热时间过长会降低酶的活性, 进而影响扩增效率及准确定量。



4) 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。如果需要定量, 也可以制备标准曲线。

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 <sup>4</sup> ~1 × 10 <sup>5</sup>	2 × 10 <sup>4</sup> ~2 × 10 <sup>5</sup>	4 × 10 <sup>4</sup> ~4 × 10 <sup>5</sup>	8 × 10 <sup>4</sup> ~8 × 10 <sup>5</sup>	2 × 10 <sup>5</sup> ~2 × 10 <sup>6</sup>
CellAmp Washing Buffer	125 $\mu$ l	250 $\mu$ l	500 $\mu$ l	1 ml	2.5 ml
CellAmp Processing Buffer	49 $\mu$ l	98 $\mu$ l	196 $\mu$ l	392 $\mu$ l	980 $\mu$ l
DNase I for Direct RNA Prep	1 $\mu$ l	2 $\mu$ l	4 $\mu$ l	8 $\mu$ l	20 $\mu$ l

注意: 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。

#### 4. DNase I (-) 操作方法 (可选)

如果添加 DNase I for Direct RNA Prep 对 Western Blot 实验有影响, 可以不添加 DNase I for Direct RNA Prep 进行细胞裂解液的制备。

注意: 使用不添加 DNase I for Direct RNA Prep 处理的样品进行 Real Time RT-PCR 解析实验时, PCR 用引物要在跨内含子区域进行设计, 以避免基因组 DNA 的影响。

##### a. 溶液的配制。

- 5X Loading Buffer 中加入 1 M DTT。

进行 Western Blot 实验时需要使用此 Buffer。使用前在微量离心管中分取适量的 5X Loading Buffer, 再按每 100  $\mu\text{l}$  的 5X Loading Buffer 中添加 10  $\mu\text{l}$  的 1 M DTT 的比例加入 DTT。

注意: 每个样品中 (细胞裂解液 10  $\mu\text{l}$ ) 加入 2.5  $\mu\text{l}$  含有 DTT 的 Loading Buffer。

##### b. 96 孔板贴壁细胞裂解液的制备

注意: 如果使用不同类型的培养板, 请参照“附录 4-d.” 建议的反应体积和反应条件进行操作。

- 1) 向 96 孔板中接种  $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^5$  cells。
- 2) 根据实验要求培养适量的细胞数。
- 3) 用枪头尽量除尽培养基。
- 4) 向各孔中添加 125  $\mu\text{l}$  的 CellAmp Washing Buffer。
- 5) 用枪头尽量吸尽 CellAmp Washing Buffer。
- 6) 向各孔中添加 50  $\mu\text{l}$  的 CellAmp Processing Buffer 溶液, 室温 (15–28°C 左右) 放置 5 min。
- 7) 用枪头将各孔的溶液反复吸打后, 转移至适当容量的微量离心管中, 75°C 水浴 5 min。
- 8) 使用上述操作得到的细胞裂解液作为模板, 可进行 Real Time RT-PCR 实验。
  - ① 操作方法参见“附录 1.” (一步法) 或“附录 2.” (两步法)。
  - ② 如果进行 25  $\mu\text{l}$  体系的一步法 Real Time RT-PCR 反应或者 10  $\mu\text{l}$  体系的反转录反应, 裂解液的用量应低于 2  $\mu\text{l}$ 。
  - ③ 裂解液的制备应于冰上操作, real time RT-PCR 反应应在制备裂解液 1 小时之内开始。裂解液可于 -80°C 保存 2 周。
- 9) 进行 Western Blot 实验时, 10  $\mu\text{l}$  的细胞裂解液中加入 2.5  $\mu\text{l}$  含有 DTT 的 Loading Buffer, 95°C 5 min 热处理后进行 SDS-PAGE 及 Western Blot 分析。

##### c. $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^5$ 悬浮细胞裂解液的制备

注意: 如果制备的裂解液高于  $1 \times 10^5$  cells, 可按比例增加试剂用量。

- 1) 计算细胞数, 将含有  $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^5$  cells 的细胞培养液转移到适当容量的离心管中。
- 2) 300g, 离心 5 min。
- 3) 用枪头尽量去尽培养基。
- 4) 向各离心管中添加 125  $\mu\text{l}$  的 CellAmp Washing Buffer。
- 5) 300g, 离心 5 min。
- 6) 用枪头尽量去尽 CellAmp Washing Buffer。
- 7) 添加 50  $\mu\text{l}$  的 CellAmp Processing Buffer 溶液, 室温 (15–28°C) 放置 5 min。
- 8) 用枪头将溶液反复吸打后, 转移到适当容量的微量离心管中, 75°C 水浴 5 min。
- 9) 使用上述操作得到的细胞裂解液作为模板进行 Real Time RT-PCR 实验。
  - ① 操作方法参见“附录 1.” (一步法) 或“附录 2.” (两步法)。
  - ② 如果进行 25  $\mu\text{l}$  体系的一步法 Real Time RT-PCR 反应或者 10  $\mu\text{l}$  体系的反转录反应, 裂解液的用量应低于 2  $\mu\text{l}$ 。
  - ③ 裂解液的制备应于冰上操作, real time RT-PCR 反应应在制备裂解液 1 小时之内开始。裂解液可于 -80°C 保存 2 周。
- 10) 进行 Western Blot 实验时, 10  $\mu\text{l}$  的细胞裂解液中加入 2.5  $\mu\text{l}$  含有 DTT 的 Loading Buffer, 95°C 5 min 热处理后进行 SDS-PAGE 及 Western Blot 分析。



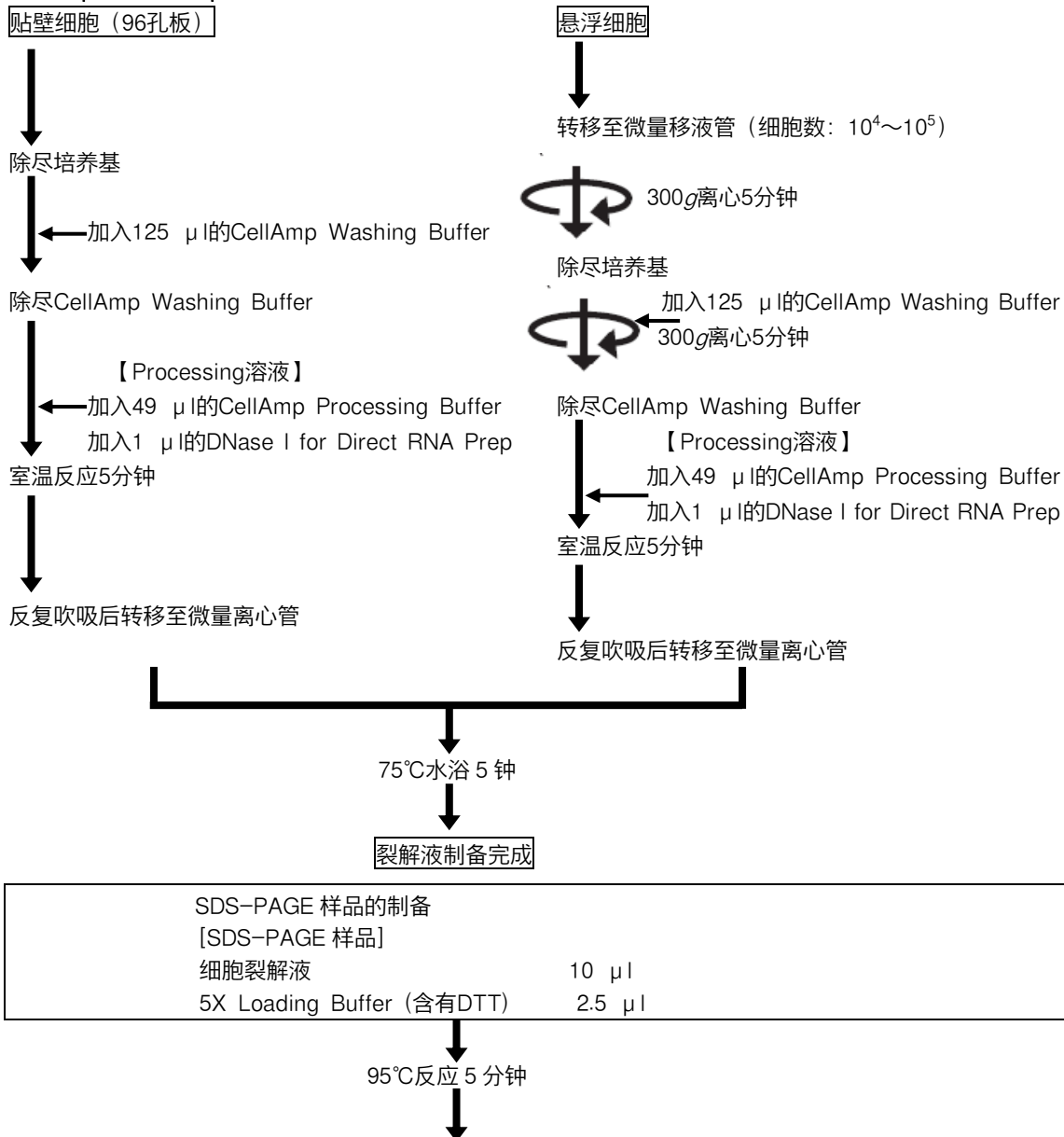
d. 不同培养板贴壁细胞的接种量和各试剂的单孔使用量

【DNase I (-) 法】

培养板	96 Well	48 Well	24 Well	12 Well	6 Well
细胞的接种量基准 (cells/well) *	$1 \times 10^4$ $\sim 1 \times 10^5$	$2 \times 10^4$ $\sim 2 \times 10^5$	$4 \times 10^4$ $\sim 4 \times 10^5$	$8 \times 10^4$ $\sim 8 \times 10^5$	$2 \times 10^5$ $\sim 2 \times 10^6$
CellAmp Washing Buffer	125 $\mu$ l	250 $\mu$ l	500 $\mu$ l	1 ml	2.5 ml
CellAmp Processing Buffer	50 $\mu$ l	100 $\mu$ l	200 $\mu$ l	400 $\mu$ l	1,000 $\mu$ l

\*: 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。

### CellAmp Direct Prep Kit for RT-PCR(Real Time)和蛋白分析操作流程



SDS-PAGE 凝胶上样

一步法 Real Time PCR

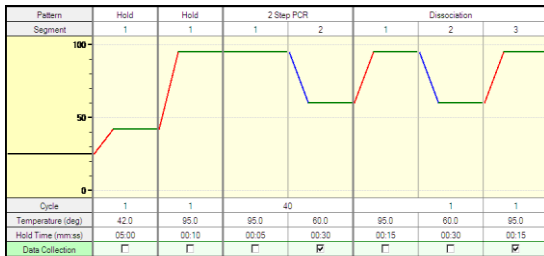
向各孔或离心管中加入  
1-2  $\mu$ l 细胞裂解液

One Step TB Green PrimeScript RT-PCR Kit  
(Code No.RR066A/B)

【Master Mix】(单次反应用量)

RNase Free dH<sub>2</sub>O 8.5 - 9.5  $\mu$ l  
2X One Step TB Green RT-PCR Buffer III 12.5  $\mu$ l  
PCR Forward Primer (10  $\mu$ M) 0.5  $\mu$ l  
PCR Reverse Primer (10  $\mu$ M) 0.5  $\mu$ l  
PrimeScript RT Enzyme Mix II 0.5  $\mu$ l  
*TaKaRa Ex Taq HS* 0.5  $\mu$ l

开始反应



Pattern 1: 反转录反应

Hold

42°C 5 min

95°C 10 sec

Pattern 2: PCR

Cycle: 40

95°C 5 sec

60°C 30 sec

Pattern 3: Dissociation

反应结束后进行分析

二步法 Real Time PCR

PrimeScript RT reagent Kit (Code No. RR037A/B)

【Master Mix】(单次反应用量)

RNase Free dH<sub>2</sub>O 4.5 - 5.5  $\mu$ l  
5X PrimeScript Buffer (for Real Time) 2.0  $\mu$ l  
Oligo dT Primer (50  $\mu$ M) 0.5  $\mu$ l  
Random 6 mers (100  $\mu$ M) 0.5  $\mu$ l  
PrimeScript RT Enzyme Mix I 0.5  $\mu$ l

向各孔或离心管中加入1-2  $\mu$ l的细胞裂解液

37°C 15 min (反转录反应)

85°C 5 sec (酶失活处理)

4°C

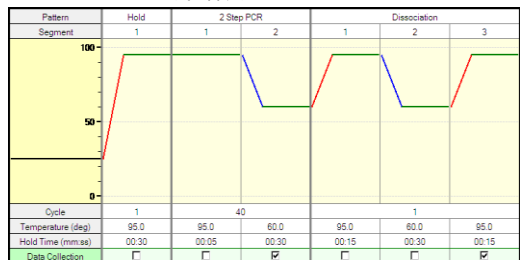
向各孔或离心管中加入2  $\mu$ l  
的反转录反应混合液

TB Green *Premix Ex Taq II* (Code No. RR820A/B)

【Master Mix】(单次反应用量)

灭菌水 8.5  $\mu$ l  
PCR Forward Primer (10  $\mu$ M) 1.0  $\mu$ l  
PCR Reverse Primer (10  $\mu$ M) 1.0  $\mu$ l  
TB Green *Premix Ex Taq II* (2X) 12.5  $\mu$ l

开始反应



Pattern 1: (预变性)  
Hold  
95°C 30 sec

Pattern 2: PCR  
Cycle: 40  
95°C 5 sec  
60°C 30 sec

Pattern 3: Dissociation



反应结束后进行分析

## ● 实验例

通过不同时间的药物刺激，对血红素加氧酶-1 (Hmox1) mRNA/蛋白质表达量的变化进行解析。

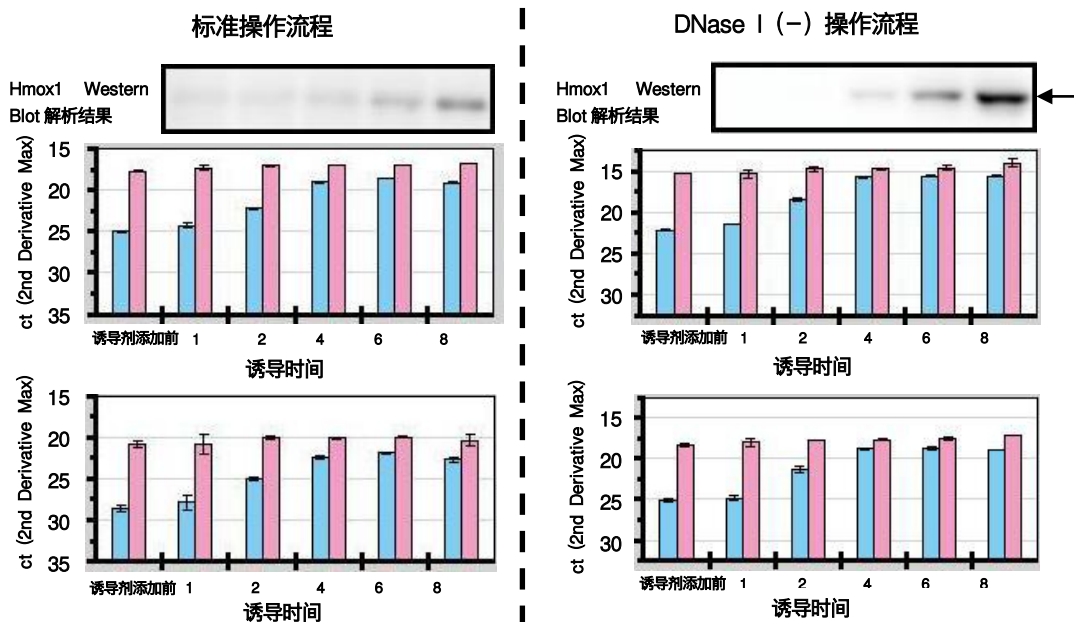
RAW264.7 细胞使用 Hmox1 的诱导剂进行刺激，对被诱导的 Hmox1 mRNA 及蛋白质的变化量，使用本 Kit 制备的细胞裂解液进行解析。

### 1. 实验方法。

- 1) 在 24 孔板中分别接种  $4 \times 10^5$  cells/well 的 RAW264.7 细胞，培养 16 小时后，加入 Hmox1 的诱导剂。添加诱导剂 1, 2, 4, 6, 8 小时后按照前面介绍的操作方法制备 200  $\mu$ l 的细胞裂解液。同时以没有使用诱导剂处理的样品为对照。
- 2) 使用 Real Time RT-PCR 方法对 Hmox1 mRNA 表达量进行解析。  
细胞裂解原液以及用 CellAmp Processing Buffer 稀释 10 倍的裂解液分别取 2  $\mu$ l 作为模板，使用 One Step TB Green PrimeScript RT-PCR Kit (Perfect Real Time) 对 Hmox1 mRNA 表达量进行解析。作为对照，对管家基因 GAPDH 进行同样的表达量解析。
- 3) 使用 western blot 法对 Hmox1 蛋白质表达量进行解析。  
细胞裂解原液 10  $\mu$ l 中加入 2.5  $\mu$ l 含有 DTT 的 Loading Buffer，95°C 5 min 热处理后进行 SDS-PAGE 电泳。Hmox1 蛋白质使用 Anti-Heme Oxygenase-1 (GST-1), Monoclonal, POD (Code No.M177) 和化学发光物质 SuperSignal<sup>®</sup> West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Fisher Scientific, Code No. 34095) 进行处理，使用 LuminoShot™ 400Jr 进行信号检测 (信号检出时间为 1 分钟)。

### 2. 实验结果。

细胞裂解原液和 10 倍稀释液作为模板，根据 Real Time RT-PCR 结果，诱导剂添加后，随着处理时间的增加，Hmox1 的 Ct 值变小，mRNA 表达量增加。根据蛋白质印迹实验结果，随着处理时间的增加，Hmox1 信号值增强。与 Real Time RT-PCR 结果相同，Hmox1 蛋白质表达量也随着处理时间的增加而增加。实验结果见下图。



#### Real Time RT-PCR 结果

样品 : 细胞裂解原液 (上图)  
细胞裂解液 10 倍稀释液 (下图)

试剂 : One Step TB Green PrimeScript RT-PCR Kit (Perfect Real Time)

装置 : Thermal Cycler Dice Real Time System

测定基因: ■ Mouse Hmx1

■ Mouse GAPDH

Primer : 根据 Perfect Real Time 系统设计

图 2 Western Blot 和 Real Time RT-PCR 实验结果比较

## ● Troubleshooting

### 1. Real Time RT-PCR 无扩增产物。

- ① 不要直接将引物与细胞裂解液混合，因为裂解液具有的 DNase 活性可能会将引物降解。
- ② 对 PCR Primer 的设计进行确认。参照 One Step TB Green PrimeScript RT-PCR Kit (Perfect Real Time) (Code No. RR066A/B) 或 One Step TB Green PrimeScript RT-PCR Kit II (Perfect Real Time) (Code No. RR086A/B) 所提供的方法。
- 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。

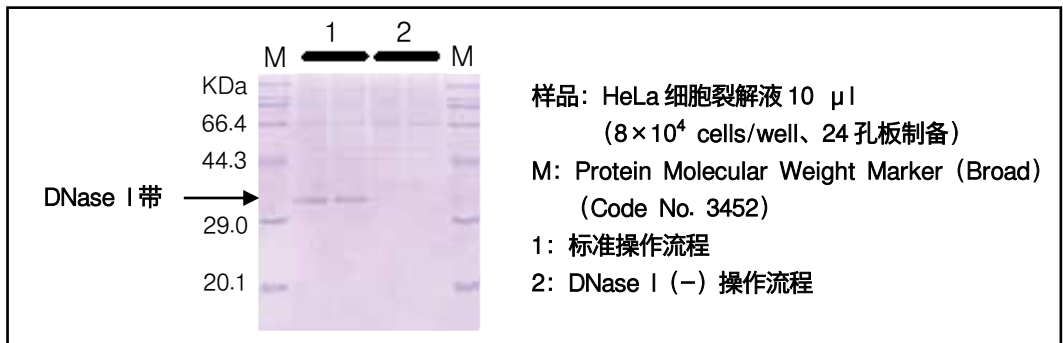
### 2. 蛋白质印迹解析无信号。

细胞数少时，蛋白质印迹解析有可能没有信号检出。这时，请按照附录 3 和附录 4 进行细胞数研讨，对实验操作流程进行优化。但是细胞数过多时，Real Time RT-PCR 扩增效率会下降，此时，可以使用 CellAmp Processing Buffer 将细胞裂解原液稀释后使用。

注意：本产品中配有 DNase I for Direct RNA Prep，可以有效去除基因组 DNA 污染，在通过 Real Time RT-PCR 方法对基因表达量进行解析时，对于引物设计不跨内含子、低表达量的基因解析等，可以避免由于基因组 DNA 混入而影响结果分析。

根据标准操作流程得到的细胞裂解液，由于加入了 DNase I for Direct RNA Prep，细胞裂解液在进行 SDS-PAGE 电泳时，会有 DNase I (31 KDa) 的电泳带出现。当由于 DNase I for Direct RNA Prep 的加入对蛋白质印迹解析有影响时，可以按照 DNase I (-) 操作方法进行细胞裂解液的制备。但要进行 Real Time RT-PCR 解析时，为了避免基因组 DNA 对解析结果的影响，PCR 引物要在跨内含子区域设计。

下图是使用标准操作流程和 DNase I (-) 操作流程获得的 HeLa 细胞裂解液 SDS-PAGE 电泳结果。



细胞裂解液 SDS-PAGE 结果 (CBB 染色)

## ● 关联产品

One Step TB Green<sup>®</sup> PrimeScript™ RT-PCR Kit II (Perfect Real Time) (Code No. RR086A/B)  
One Step TB Green<sup>®</sup> PrimeScript™ RT-PCR Kit (Perfect Real Time) (Code No. RR066A/B)  
One Step TB Green<sup>®</sup> PrimeScript™ PLUS RT-PCR Kit (Perfect Real Time) (Code No. RR096A/B)  
One Step PrimeScript™ RT-PCR Kit (Perfect Real Time) (Code No. RR064A/B)  
PrimeScript™ RT reagent Kit (Perfect Real Time) (Code No. RR037A/B)  
TB Green<sup>®</sup> Premix DimerEraser™ (Perfect Real Time) (Code No. RR091A/B)  
TB Green<sup>®</sup> Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus) (Code No. RR820A/B)  
TB Green<sup>®</sup> Premix Ex Taq™ (Tli RNaseH Plus) (Code No. RR420A/B)  
Premix Ex Taq™ (Probe qPCR) (Code No. RR390A/B)

*TaKaRa Ex Taq* and TB Green are registered trademarks of Takara Bio Inc.  
CellAmp, PrimeScript, *Premix Ex Taq*, DimerEraser, and Thermal Cycler Dice are trademarks of Takara Bio Inc.

**注意**

本产品仅供科学研究使用，不能用于人、动物的医疗或诊断程序，不能使用本产品作为食品、化妆品或家庭用品等。

未经Takara Bio Inc.书面许可授权或批准，不得制造、许诺销售、销售、进口Takara产品，或者使用Takara产品所有的相关专利及相关商标。

如果您需要其他用途的许可授权，请联络我们，或访问我们网站[www.takarabio.com](http://www.takarabio.com)。

您使用本产品必须遵守产品网页上适用的全部许可要求。阅读、了解并遵守此类声明的所有限制性条款是您的责任。

所有商标均属于各自商标所有者的财产。某些商标并未在全部行政区注册。

本文件由宝日生物技术（北京）有限公司翻译制作，最新版本文件请参考 Takara Bio Inc.网站。为正确使用 Takara 产品，您应当掌握本产品的相关知识和使用说明。

**技术咨询热线：**

0411-87641685, 87641686

4006518761, 4006518769

**TAKARA BIO INC.**

URL: <https://www.takarabiomed.com.cn>

v202204Da