



## **CytoCt™ RT-qPCR System User Manual**

——用于定量检测培养细胞中基因的表达

### **CytoCt™ Cell Lysis Kit**

Cat. No: QP309 (20 reactions), QP310 (100 reactions)

### **CytoCt™ cDNA Synthesis Kit**

Cat. No: QP356 (20 reactions)

### **CytoCt™ Probe One-Step RT-qPCR Kit**

Cat. No: QP376 (100 reactions), QP386 (without ROX, 100 reactions)

### **CytoCt™ One-Step SYBR® Green RT-qPCR Kit**

Cat. No: QP371 (100 reactions), QP381 (without ROX, 100 reactions)

GeneCopoeia, Inc.      广州易锦生物技术有限公司

广州高新技术产业开发区广州科学城  
掬泉路 3 号广州国际企业孵化器 F 区 8 楼  
邮编: 510663  
电话: 4006-020-200  
邮箱: sales@igenebio.com  
网址: [www.genecopoeia.com](http://www.genecopoeia.com) (英文)  
[www.igenebio.com](http://www.igenebio.com) (中文)

© 2021 GeneCopoeia, Inc.

## CytoCt™ RT-qPCR System

- I. 产品描述
- II. 产品组分及存储
- III. 实验前准备
- IV. 实验过程
- V. 使用许可与质量保证

### I. 产品描述

CytoCt™ RT-qPCR 是一种可以直接定量检测 10-100,000 细胞中不同基因的表达水平的体系，该过程无需提取 RNA，具有实验方便快捷、数据可靠、灵敏度高优势。该体系包括：CytoCt™ Cell Lysis Kit, CytoCt™ cDNA Synthesis Kit, CytoCt™ Probe One-Step RT-qPCR Kit, 和 CytoCt™ One-Step SYBR® Green RT-qPCR Kit。

### II. 产品组分及存储

-20°C 储存至少 12 月，避免反复冻融。

货号	产品名称	组成货号	产品组分	组分货号	规格
QP309	CytoCt™ Cell Lysis Kit (20 rxns)	N/A	CytoCt lysis buffer	QP309-01	1x 1mL
		N/A	DNase I	QP309-02	1x 40 µl
QP310	CytoCt™ Cell Lysis Kit (100 rxns)	N/A	CytoCt lysis buffer	QP309-01	5x 1 ml
		N/A	DNase I	QP310-02	1x 200 µL
QP356	CytoCt™ cDNA Synthesis Kit (20 rxns)	QP309	CytoCt lysis buffer	QP309-01	1x 1 ml
			DNase I	QP309-02	1x 40 µl
		QP056	SureScript RTase mix (20×)	QP056-01	1x 20 µl
			SureScript RT reaction buffer (5×)	QP056-02	1x 80 µl
ddH2O (RNase/DNase free)	QP006-07	1x 1 ml			
QP376	CytoCt™ Probe One-Step RT-qPCR Kit (100 rxns)	QP310	CytoCt™ lysis buffer	QP309-01	5x 1 ml
			DNase I	QP310-02	1x 200 µl
		QP076	Probe One-Step RT-qPCR mix (5×)	QP076-01	1x 800 µl
			BlazeTaq™ One-Step RTase mix	QP076-02	1x 80 µl
ROX reference dye	QP001-02	1x 80 µl			
QP386	CytoCt™ Probe One-Step RT-qPCR Kit (without ROX, 100 rxns)	QP310	CytoCt™ lysis buffer	QP309-01	5x 1 ml
			DNase I	QP310-02	1x 200 µl
		QP086	Probe One-Step RT-qPCR mix (5×)	QP086-01	1x 800 µl
			BlazeTaq™ One-Step RTase mix	QP086-02	1x 80 µl

<b>QP371</b>	<b>CytoCt™ One-Step SYBR® Green RT-qPCR Kit (100 rxns)</b>	<b>QP310</b>	CytoCt™ lysis buffer	QP309-01	5x 1 ml
			DNase I	QP310-02	1x 200 µl
		<b>QP071</b>	BlazeTaq™ One-Step RT-qPCR	QP071-01	1x 800 µl
			BlazeTaq™ RTase mix (50×)	QP071-02	1x 80 µl
			ROX reference dye	QP001-02	1x 80 µl
<b>QP381</b>	<b>CytoCt™ One-Step SYBR® Green RT-qPCR Kit (without ROX, 100 rxns)</b>	<b>QP310</b>	CytoCt™ lysis buffer	QP309-01	5x 1 ml
			DNase I	QP310-02	1x 200 µl
		<b>QP081</b>	BlazeTaq™ One-Step RT-qPCR	QP081-01	1x 800 µl
			BlazeTaq™ RTase mix (50×)	QP081-02	80 µl

### III. 实验前准备

- 1) 尽可能使用不含核糖核酸酶的无菌一次性塑料容器。如果不能去除核糖核酸酶，使用前应进行灭菌。如果使用玻璃器皿，应在 160℃ 下干热灭菌至少 2 小时，或在 37℃ 下用 0.1% DEPC 水处理 12 小时，然后进行高压灭菌。
- 2) RNA 实验中建议使用专用的仪器设备，专用的仪器设备不能用于其他实验。
- 3) 尽量使用 0.1% DEPC 水配制试剂，使用前需灭菌。如果试剂不能灭菌，可用无菌容器和无菌水配制，使用前过滤。
- 4) 处理化学品时，建议穿戴实验服、一次性手套和护目镜。

### 样品准备

收集 PBS 缓冲液中的细胞并计数细胞数。

### 注意：

- 1) 将试剂盒储存在 -20℃。避免将试剂储存在 4℃ 或室温下。
- 2) 使用前，将试管轻轻翻转几次，充分混合试剂，避免出现气泡，然后短暂离心。
- 3) 所有反应配制的过程均需在冰上进行，使用 RNase free 的试剂和耗材，以减少 RNA 降解的风险。
- 4) 实验前请仔细阅读说明。

## IV. 实验过程

### 1. 制备 CytoCt Lysis Buffer Mix:

每个反应的体系为：将 50 $\mu$ l **Cell Lysis Buffer** 与 2 $\mu$ l **DNase I** 混合。冰上放置，并在 2 小时内使用。

#### a. 在试管中处理悬浮细胞

- 计数细胞数。每孔（管）转移 10–100,000 个细胞至 96 孔 PCR 板或 PCR 管。
- 以 1000 x g 转速，离心 5-10 分钟。在不干扰细胞颗粒的情况下，尽可能多地去除培养基。
- 用 125 $\mu$ l 室温 PBS 清洗细胞。以 1000 x g 转速离心 5-10 分钟。在不干扰细胞颗粒的情况下，小心移除 PBS 缓冲液。
- 向每个孔或管中添加 50 $\mu$ l CytoCt Lysis Buffer Mix (with DNase I)。
- 移液枪上下吹打五次，以确保细胞颗粒完全再悬浮。
- 在室温下培养 10 分钟。
- 转至步骤 2

#### b. 在 96 孔培养板中处理贴壁细胞

- 将细胞提前接种于 96 孔培养板中，使细胞分裂达到 50% - 90% 的丰度。
- 通过移液器完全去除细胞培养基。
- 用 125 $\mu$ l 室温 PBS 清洗细胞两次。完全移除 PBS 缓冲液。
- 向每个孔中添加 50 $\mu$ l CytoCt Lysis Buffer Mix (with DNase I)。摇动平板几次，让 CytoCt Lysis Buffer Mix 覆盖细胞。
- 在室温下培养 10 分钟，将每个细胞裂解物转移到 PCR 板上。
- 转至步骤 2

### 2. 按照以下条件进行孵育。

---

温度	时间
25°C	2 min
37°C	5 min
75°C	10 min

---

注：细胞裂解液可在冰上保存 6 小时，-20°C 保存 48 小时，-80°C 存放一个月。

### 3. 细胞裂解液可直接用于 RT 反应或一步法 RT- qPCR:

**RT 反应（举例 1）：**

（1）每个 RT 反应中使用 1-5  $\mu\text{l}$  细胞裂解液。以配合使用 SureScript™ First-Strand cDNA Synthesis Kit 为例，按下表准备 RT 反应体系。

试剂	体积	终浓度
SureScript RTase Mix (20 $\times$ )	1 $\mu\text{l}$	1 $\times$
SureScript RT Reaction Buffer (5 $\times$ )	4 $\mu\text{l}$	1 $\times$
细胞裂解液	1-5 $\mu\text{l}$	-
ddH <sub>2</sub> O (RNase/DNase free)	to 20 $\mu\text{l}$	-

注：该试剂盒的敏感性范围从 10 个细胞到 100,000 个细胞，取决于靶标的丰度和 RNA 质量。一般情况下，表格中细胞裂解液的量为推荐量。细胞裂解液使用量范围为 1-5  $\mu\text{l}$ 。

（2）反转录反应程序设置：

温度	时间
25 $^{\circ}\text{C}$	5 min
42 $^{\circ}\text{C}$	15 min*
85 $^{\circ}\text{C}$	5 min
4 $^{\circ}\text{C}$	hold

\*通常，15 min 足以进行大多数 RNA 模板的逆转录反应。对于更复杂或更长的模板，可根据实际情况适当延长反应时间，一般不超过 60 min。

（3）RT 反应产物可直接用于下一步，无需纯化。对于标准的 25 $\mu\text{l}$  PCR 反应，建议体积为 0.5 $\mu\text{l}$ ~2 $\mu\text{l}$  的未稀释 cDNA。如果进行定量 PCR，建议对 cDNA 进行 1:5~1:20 稀释，每 20 $\mu\text{l}$  qPCR 反应加入 2 $\mu\text{l}$ 。

**一步法 RT-qPCR 反应（举例 2）：**

用 ddH<sub>2</sub>O 进行 5 倍稀释细胞裂解液，每个 RT-qPCR 反应中使用 1-2  $\mu\text{l}$  细胞裂解液。

（1）以配合使用 BlazeTaq™ One-Step SYBR® Green RT-qPCR Kit （或 BlazeTaq™ Probe One-Step RT-qPCR Kit）为例，根据下面表格准备 RT-qPCR 反应体系。

试剂	体积 <sup>a</sup>	终浓度
BlazeTaq One Step RT-qPCR Mix (5×)	4 µl	1×
BlazeTaq RTase Mix (50×)	0.4 µl	1×
PCR forward primer (10 µM) <sup>b</sup>	0.4 µl	0.2 µM <sup>c</sup>
PCR reverse primer (10 µM)	0.4 µl	0.2 µM
细胞裂解液	1-2 µl	
ROX Reference Dye <sup>d</sup> (30 µM), <i>optional</i>	0.4 - 0.1 µl	
dd H <sub>2</sub> O		
▪ Not using ROX Reference Dye	9.8 µl	
▪ Using ROX Reference Dye	9.4-9.7 µl	
<b>Total</b>	<b>20 µl</b>	

a. 本试剂盒已针对 20 µL 反应体系做了优化。不推荐使用 10 µL 或更小体积的反应体系，容易增大误差而降低结果的准确性。

b. 引物是确保一步法 RT-qPCR 成功的重要因素之一。GeneCopia 的 All-in-One™ 人类、小鼠和大鼠等物种的引物均已通过验证，即使在低拷贝数基因的情况下也能提供特异性和灵敏的扩增。此外，为了设计您自己的引物，您可以选择使用 Oligo 引物分析软件 (Molecular Biology Insights) 或 Primer Premier 软件 (Premier Biosoft International)

c. qPCR 引物反应终浓度一般介于 0.2 ~0.6 µM 之间。通常 PCR 反应体系中引物的终浓度为 0.2 µM 时，可以获得比较好的实验结果。如果 qPCR 扩增效率比较低，可以适当地提高引物使用浓度，但是过高的引物浓度可能会降低 qPCR 扩增特异性。

d. ROX Reference Dye 仅在 BlazeTaq™ One-Step SYBR® Green RT-qPCR kit (货号 QP071, QP072, QP073) 中提供，用于校正孔与孔之间产生的荧光信号误差。不同的定量 PCR 仪使用的 ROX Reference Dye 浓度不同，因此，根据不同的定量 PCR 仪器，选择使用不同浓度的 ROX Reference Dye。常见的定量 PCR 仪，使用 ROX Reference Dye 参考如下：

仪器类型	ROX 使用量 (20 µL 体系)	终浓度
BioRad iCycler, MyiQ, iQ5, CFX-96, CFX-384, Eppendorf Mastercycler realplex, Roche LightCycler 480, LightCycler 2.0	None	No ROX
ABI PRISM 7000/7300/7700/7900HT and 7900HTFast, ABI Step One, ABI Step One Plus	0.4 µl (0.2-0.4 µl)	600 nM (300-600 nM)
ABI 7500, 7500 Fast, ABI ViiA7, Stratagene Mx3000P, Mx3005P, Mx4000	0.1 µl (0.02-0.1 µl)	150 nM (30-150 nM)

注：其他未列在上表中的定量 PCR 仪器类型，请根据仪器的使用说明书摸索合适的 ROX Reference Dye。

f. 按实验需求准备如下对照组：

**No-RT controls:** 为检测 RNA 样本中是否有基因组 DNA 的污染，在反应体系中不需加入 BlazeTaq RTase Mix (50×)。

**No-template controls:** 为检测反应体系中是否有基因组 DNA 的污染，在反应体系中不需加入 RNA 样本。

(2) 将 RT-qPCR 反应体系充分混合，加入 PCR 反应管中。

(3) 短暂离心，确保反应液中无气泡且均置于 PCR 反应管或平板底部。

(4) 根据下表设置 RT-qPCR 程序进行反应(以 Bio-Rad iQ™ 5 qPCR 仪推荐的反应程序为例)。

循环数	步骤	温度	时间	检测与否
1	逆转录	42°C	10 min	否
1	预变性	95°C	3 min	否
40	变性	95°C	10 sec	否
	延伸	60°C	30 sec	是

**注意：**

a. 本试剂盒使用 SYBR Green 染料监测 qPCR 反应，因此可以在 qPCR 循环结束后立即进行熔解曲线分析，判定扩增产物的特异性。以 Bio-Rad iQ5 qPCR 仪推荐的反应程序为例。

温度范围	升温速率	恒定温度	检测与否
72–95°C	0.5°C/单位时间	6 sec/单位时间	是
25°C		30 sec	否

*请参照不同的定量 PCR 仪器，选择合适的熔解曲线分析反应程序。*

b. 42°C 的温度条件对于逆转录反应是最佳的，设置时请避免低于 42°C。

c. 通常情况下使用默认推荐的 60°C 作为反应体系中的延伸温度即可。如需调整延伸温度可根据引物的 Tm 值在 60 - 65°C 范围内进行调整。

d. qPCR 扩增产物的长度一般为 80~150 bp 之间，个别情况下扩增产物的长度达到 500 bp 也是可以接受的。

e. 以上的反应条件主要参考 Bio-rad qPCR 仪进行设置，若使用其他的定量 PCR 仪，请参考对应的仪器使用说明书来设置具体的延伸时间及熔解曲线分析反应程序。

## V. Limited Use License and Warranty

### Limited Use License

The following terms and conditions apply to use of CytoCt™ RT-qPCR System (the Product). If the terms and conditions are not acceptable, the Product in its entirety must be returned to GeneCopoeia within 5 calendar days. A limited End-User license is granted to the purchaser of the Product. The Product shall be used by the purchaser for internal research purposes only. The Product is expressly not designed, intended, or warranted for use in humans or for therapeutic or diagnostic use. The Product must not be resold, repackaged or modified for resale, or used to manufacture commercial products without prior written consent from GeneCopoeia. This Product should be used in accordance with the NIH guidelines developed for recombinant DNA and genetic research. Use of any part of the Product constitutes acceptance of the above terms.

### Limited Warranty

GeneCopoeia warrants that the Product meets the specifications described in the accompanying Product Datasheet. If it is proven to the satisfaction of GeneCopoeia that the Product fails to meet these specifications, GeneCopoeia will replace the Product. In the event a replacement cannot be provided, GeneCopoeia will provide the purchaser with a refund. This limited warranty shall not extend to anyone other than the original purchaser of the Product. Notice of nonconforming products must be made to GeneCopoeia within 30 days of receipt of the Product. GeneCopoeia's liability is expressly limited to replacement of Product or a refund limited to the actual purchase price. GeneCopoeia's liability does not extend to any damages arising from use or improper use of the Product, or losses associated with the use of additional materials or reagents. This limited warranty is the sole and exclusive warranty. GeneCopoeia does not provide any other warranties of any kind, expressed or implied, including the merchantability or fitness of the Product for a particular purpose.

GeneCopoeia is committed to providing our customers with high-quality products. If you should have any questions or concerns about any GeneCopoeia products, please contact us at 4006-020-200.

© 2021, GeneCopoeia, Inc.