

# 荧光定量 PCR 基因表达检测试剂盒

## 说明书(通用版)

### 前言

随着荧光定量PCR技术的成熟和荧光定量PCR仪的普及,用传统的半定量方法检测目的基因表达量的升高或者降低,已经远远不能满足当前科研的需要,针对当前研究的热点基因,闪晶生物及时地从美国biosuper公司引进不同物种、不同基因的荧光定量PCR检测试剂盒。该试剂盒包含了目的基因和管家基因的引物、taqman探针(荧光探针)、反转录试剂、荧光定量PCR试剂、操作说明书等,用户只需将提好的RNA加入就可以进行荧光定量PCR实验,操作方便简单、适合多种荧光定量PCR仪,同时也避免了自己设计、合成引物探针的烦恼。

### 基本原理

先用随机引物将 RNA 反转录成 cDNA,然后设计特异性的引物和荧光探针(TaqMan 探针),进行荧光定量 PCR 检测。TaqMan 探针是一种寡核苷酸探针,它设计为与目标序列上游引物和下游引物之间的序列配对。荧光基团连接在探针的 5' 末端,而淬灭剂则在 3' 末端。当完整的探针与目标序列配对时,荧光基团发射的荧光因与 3' 端的淬灭剂接近而被淬灭,但在进行延伸反应时,qTaq 聚合酶的 5' 外切酶活性将探针进行酶切,使得荧光基团与淬灭剂分离,荧光强度得到检测。随着扩增循环数的增加,释放出来的荧光基团不断积累,因此荧光强度与扩增产物的数量呈正比关系。

**试剂盒规格** 25 次

100 次

### 试剂盒组成

序号	名称	25 次	100 次
1	RT-buffer	325 u1	1300 u1
2	Mix enzyme	50 u1	200 u1
3	T-probe	25 u1	100 u1
4	T-fluo-PCR buffer	650 u1	2600 u1
5	I-probe	25 u1	100 u1
6	I-fluo-PCR buffer	650 u1	2600 u1
7	qTaq polymerase	100 u1	400 u1
8	DEPC-H2O	1 支	1 支
9	说明书	1 份	1 份

**试剂说明:**

**RT-buffer:**含有 dNTPs、oligo(N)等

**Mix enzyme:**含有反转录酶、RNA 酶抑制剂等

**T-probe:**检测目的基因的荧光探针, 5' 端 fam 标记, 3' 端 tamra 标记

**T-fluo-PCR buffer:**含有目的基因的特异性引物、dNTPs 等

**I-probe:**检测管家基因的荧光探针, 5' 端 fam 标记, 3' 端 tamra 标记

**I-fluo-PCR buffer:**含有管家基因的特异性引物、dNTPs 等

- RNA 的提取请参照 Trizol 说明书, 本试剂盒不提供 RNA 提取试剂和操作流程。

## 操作流程

### 反转录反应

1. 按下列组份配制RT反应液 (反应液请在冰上配制):

RT-buffer	13ul
Mix enzyme	2ul
RNA	500ng
DEPC-H2O	up to 20ul
Total	20ul

2. 反转录反应条件如下:

25°C	10 分钟
40°C	30 分钟
95°C	2 分钟

### Real Time PCR反应

1. 目的基因荧光定量 PCR 反应体系的配制 (反应液请在冰上配制):

T-fluo-PCR buffer	26
T-probe	1ul
qTaq polymerase	2ul
cDNA	1ul
Total	30ul

2. 管家基因荧光定量 PCR 反应体系的配制 (反应液请在冰上配制):

I-fluo-PCR buffer	26
I-probe	1ul
qTaq polymerase	2ul
cDNA	1ul

Total 30ul

### 3. 标准曲线反应体系的配制（反应液请在冰上配制）：

随机取一管cDNA，然后用双蒸水按  $10^0$ 、 $10^1$ 、 $10^2$ 、 $10^3$ 梯度稀释（10倍梯度稀释），然后各取1  $\mu$ l进行Real Time PCR反应，对应的管家拷贝数分别为： $10^7$ /ml、 $10^6$ /ml、 $10^5$ /ml、 $10^4$ /ml。

I-fluo-PCR buffer 26  
I-probe 1ul  
qTaq polymerase 2ul  
cDNA 1ul（分别用上述 4 个稀释度的 cDNA）  
Total 30ul

### 4. Real Time PCR反应，PCR反应条件

#### Roche lightcycler 荧光仪的程序设置

94°C 3 分钟 1 cyclor  
94°C 5 秒 }  
60°C 20 秒 } 40cyclor

#### ABI 系列 5700、7700、icycler、MJ、Rotogene、FTC2000、Slan 等荧光仪的程序设置

94°C 4 分钟 1 cyclor  
94°C 20 秒 }  
60°C 30 秒 } 40cyclor

## 实验结果分析

实验数据分析可以采用 2 种方法：

1.  $2^{-\Delta \Delta Ct}$  表示的是实验组目的基因的表达相对于对照组的变化倍数，使用这一方法可以直接得到目的基因相对于管家基因的定量。

$$\Delta \Delta Ct = (Ct, \text{目的基因} - Ct, \text{管家基因})_{\text{实验组}} - (Ct, \text{目的基因} - Ct, \text{管家基因})_{\text{对照组}}$$

2. 实验组目的基因的表达相对于对照组的变化倍数 = (目的基因的拷贝数/管家基因的拷贝数) 实验组  $\div$  (目的基因的拷贝数/管家基因的拷贝数) 对照组

## 可能出现的问题和原因

问题	原因
目的基因没有信号，管家基因有信号	可能是目的基因的丰度较低或者抽提过程中降解比较厉害，可以加大标本提取量或者增加 RNA 的量

管家基因只能稀释 2-3 个梯度	可能抽提过程中 RNA 降解或者标本量不够
目的基因和管家基因都没有信号	可能没有提到 RNA, 重新跑电泳, 对 RNA 进行鉴定

### 注意事项

1. 在实验前应仔细阅读此说明书。
2. 实验操作的各个阶段应在不同的实验室或在实验室相对隔离的不同区域内进行, 一般分为试剂准备区, 样品处理区, PCR 反应及产物检测区。
3. 试剂准备和样品处理应在超净工作台中进行。
4. 实验操作的各阶段应使用专用的仪器和设备, 以防止污染。
5. 标本采集用品, 实验操作所需的消耗用品应一次性使用, 使用前进行无菌处理。
6. 实验操作过程中应穿工作服, 戴一次性塑料薄膜手套。

### 参考文献

1. Livak KJ, Schmittgen TD: Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>(Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001, 25:402-408.
2. L D Ke, Z Chen .A reliability test of standard-based quantitative PCR: exogenous vs endogenous standards *Mol Cell Probes*. 2000 Apr;14(2):127-35.
3. Weihong Liu and David A. Saint Validation of a quantitative method for real time PCR kinetics *Biochemical and Biophysical Research Communications* 294 (2002) 347-353

### 储存

反应试剂盒存于-20 °C保存, 尽量减少反复冻融。

### 其它相关产品信息

Trizol ZN00801 qTaq 酶 ZP00101 sybr green I ZS00201 real time PCR core kit ZK00713



## 上海闪晶分子生物科技有限公司

地址: 上海市闵行区北桥镇吴河路328号A栋2楼

邮编: 201109

联系: 市场部

电话: 54460832 800-988-1995

E-mail: master@shinegene.org.cn

网址: www.shinegene.org.cn