天净沙系列

CAT#:14-001aTL

低温运输，-20℃保存

天净沙

人端粒绝对长度检测试剂盒（染料法 qPCR）

Human Absolute Telomere Length Detection Kit (SYBR qPCR Method)

使用手册 V0.5

北京天净沙基因科技有限公司

网址：www.tjs.bio；电话：400-1078566；电邮：order@tjs.bio

产品及特点

端粒是指真核细胞染色体末端独特的蛋白质-DNA 结构，人端粒由 TTAGGG 重复串联构成，长度约为 30～50 Kb。端粒对于人染色体的稳定非常重要，因此检测人端粒长度具有重要的意义。为此，本公司根据染料法荧光定量 PCR 原理，开发了本产品。它具有下列特点：

1. 即开即用，用户只需要提供 DNA 模板。
2. 操作只需要半天，比 Southern 杂交检测法快 3-5 天时间。
3. 提供端粒阳性对照，可通过标准曲线对待测样本进行绝对定量，能更准确地测定样本中端粒的总长度。
4. 提供单拷贝基因阳性对照，可计算待测样本的细胞总数，由于每个细胞端粒数固定，故可计算出每个端粒的长度。
5. 精确度好，可以达到几十 bp。
6. 本产品足够 50 次 20 μL 体系的绝对端粒长度染料法 PCR 反应。
7. 本产品只能用于科研。

规格及成分

本产品采用十一孔盒包装

成分	编号	规格	包装
2×SYBR qPCR MasterMix	990408	500 μL	0.5 mL 本色管
荧光 PCR 专用模板稀释液	180701	1 mL	1.5 mL 绿盖管
超纯水	210806	1 mL	1.5 mL 蓝盖管
人端粒染料法 qPCR 引物干粉	yp14-001aTL	50 次	0.5 mL 白盖管
人端粒 DNA 阳性对照 1E7 拷贝/μL	pc15-001TL	50 μL	0.5 mL 红盖管
人单基因 DNA 阳性对照 1E7 拷贝/μL	pc15-001IF	50 μL	0.5 mL 黄盖管
使用手册	sc14-001aTL	1 份	无

注意：引物干粉在使用前需要短暂离心，然后在离心管中加入 110 μL 的超纯水充分混匀后得到引物混合液再使用，未用完的需要-20℃保存。

运输及保存

低温运输，-20℃避光保存，保存期限为一年。两个阳性对照需要单独放置，不要污染其他试剂。

自备试剂

样品 DNA。

使用方法

一、人端粒 DNA/人单基因 DNA 标曲样本的制备（以 1E1-1E6 拷贝/μL 这 6 个 10 倍稀释度为例）。

1. 标记 6 个离心管，分别为 A6、A5、A4、A3、A2、A1。

2. 用带芯枪头在第 6 号管中加入 45 μL 荧光 PCR 专用模板稀释液，在其余管中加入 45 μL 荧光 PCR 专用模板稀释液（最好用带芯枪头，下同）。
3. 在 6 号管中加入 5 μL 1E7 拷贝/μL 的人端粒 DNA 阳性对照，充分震荡 1 分钟，得人端粒 DNA 浓度均为 1E6 拷贝/μL 的标准曲线样品。放冰上待用。
4. 换枪头，在 5 号管中加入 5 μL 1E6 拷贝/μL 的人端粒 DNA 阳性对照(上步稀释所得)，充分震荡 1 分钟，得人端粒 DNA 浓度为 1E5 拷贝/μL 的标准曲线样品。放冰上待用。
5. 换枪头，在 4 号管中加入 5 μL 1E5 拷贝/μL 的人端粒 DNA 阳性对照(上步稀释所得)，充分震荡 1 分钟，得人端粒 DNA 浓度为 1E4 拷贝/μL 的标准曲线样品。放冰上待用。
6. 重复上面的操作直到得到 6 个稀释度的人端粒 DNA 标准曲线样品。放冰上待用。
7. 再标记 6 个离心管，分别为 B6、B5、B4、B3、B2、B1。重复 1-6 步，将人端粒 DNA 阳性对照换为人单基因 DNA 阳性对照，即得 6 个稀释度的人单基因 DNA 标准曲线样品。放冰上待用。

二、样本 DNA 制备

8. 用自选方法纯化样品的 DNA,本试剂盒跟市场上大多数 DNA 提取试剂盒兼容。

三、染料法 qPCR 反应（20 μL 体系，在样品制备室进行）

9. 如果有 N 个样本，每个样本做 1 次重复，则标记 N+13 个 PCR 反应管，N 个用于待测样本，1 个用于阴性对照，6 个用于人端粒 DNA 标准曲线反应，6 个用于人单基因 DNA 标准曲线反应。如果做三次重复，则反应数需要相应增加。为方便叙述，下面以 1 次重复为例描述操作流程。按下表在各管中加入下列成分：

成分	样品管	扩增 阴性对照管	A1-A6 号 标曲样本管	B1-B6 号 标曲样本管
2×SYBR qPCR MasterMix	各 10 μL	10 μL	各 10 μL	各 10 μL
人端粒染料法 qPCR 引物混合液	4 μL	4 μL	4 μL	4 μL
待测 DNA 样本	6 μL	不加	不加	不加
超纯水	不加	6 μL	不加	不加
人端粒 DNA 标准曲线样品 A1-A6 号	不加	不加	各 6 μL (A1 号样到 A1 号管)	不加

人单基因 DNA 标准曲线样品 B1-B6 号	不加	不加	不加	各 6 μL (B1 号样到 B1 号管)

10. 盖上盖子后上机，按下面参数进行 PCR:

过程	温度	时间
预变性	95℃	4 分钟
PCR 反应 (35-40 个循环)	95℃	15 秒
	55℃	35 秒
	72℃	45 秒，采集 SYBR 通道的荧光信号

四、数据分析

11. 通过溶解曲线分析排除无效数据。有 Ct 值，但 Tm 值跟阳性对照 Tm 不一样的结果，归为假阳性，此样本 Ct 数据无效，不予以分析。Tm 跟阳性对照 Tm 一致的，为有效 Ct。
12. 如果两种阴性对照（样品制备阴性对照和 PCR 阴性对照）的溶解曲线所得 Tm 值跟阳性对照的 Tm 值一样，说明环境或试剂可能有过去的 PCR 扩增产物污染，则此次实验无效，需要解决污染问题再进行实验。如果两种阳性对照（样品制备阴性对照和 PCR 阴性对照）无 Ct 值则无效。
13. 如果两种阴性对照（样品制备阴性对照和 PCR 阴性对照）是假阳性，有 Ct 但 Tm 与阳性样本不同，实验有效可以继续分析其它样品有效数据。
14. 确定待测样本端粒浓度（拷贝/μL）：以端粒 DNA 阳性对照浓度的 log 值为横轴，以 A1-A6 管测得有效 Ct 值为纵轴，绘制标准曲线。再以待测样品有效 Ct 值为从标准曲线上推算出端粒 DNA 浓度的 log 值，再推算出待测样本中端粒的总浓度（总拷贝/μL）。
15. 确定待测样本细胞浓度（细胞/μL）：以单基因 DNA 阳性对照浓度的 log 值为横轴，以 B1-B6 管测得有效 Ct 值为纵轴，绘制标准曲线。再以待测样品有效 Ct 值从标准曲线上推算出单基因 DNA 浓度的 log 值，再推算出其浓度（拷贝/μL）。由于每个细胞有两个单基因，故拷贝/2 μL=细胞/μL。
16. 由于一个细胞有 23 对（46 条）染色体，每条染色体有两个端粒，故一个细胞有 92 个端粒。如果 1 μL 中有 N 个细胞，则有 92N 个端粒。
17. 每个端粒的平均长度=端粒总拷贝数（来于第 10 步）/92N 端粒。

关联产品	人端粒绝对长度检测试剂盒（探针法 qPCR）