天净沙系列

CAT#:17-106aTL

低温运输，-20℃保存

天净沙

猴端粒绝对长度检测试剂盒（探针法 qPCR）

Monkey Absolute Telomere Length Assay（Probe qPCR）

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，猴端粒由 TTAGGG 重复串联构成，长度约为 30～50 Kb。端粒对于猴染色体的稳定非常重要，因此检测猴端粒长度具有重要的意义。为此，本公司根据探针法荧光定量 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. 一管式操作，同时得到 FAM（端粒）和 Cy5（单基因）信号，变异系数小。
4. 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。
5. 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。
6. 精确度好，可以达到几十 bp。
7. 本产品足够 50 次 20 μL 体系的绝对端粒长度探针法 PCR 反应。
8. 本产品只能用于科研。

规格及成分

本产品采用五孔盒包装

成分	编号	规格	包装
2×Probe qPCR MasterMix	981201	500 μL	0.5 mL 本色管
超纯水	210806	1 mL	1.5 mL 蓝盖管
猴端粒 qPCR 引物-探针干粉(含内参引物探针)	yp17-106aTL	50 次	0.5 mL 白盖管
猴端粒 DNA 阳性对照 1E7 拷贝/μL	pc15-106TL	50 μL	0.5 mL 红盖管
猴单基因 DNA 阳性对照 1E7 拷贝/μL	pc15-106IF	50 μL	0.5 mL 黄盖管
使用手册	sc17-106aTL	1 份	无

注意：引物-探针干粉在使用前需要短暂离心，然后在离心管中加入 220 μL 超纯水充分混匀后得到引物-探针混合液再使用，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、联合标曲样本的制备（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 6、5、4、3、2、1。
2. 用带芯枪头在第 6 号管中加入 40 μL 荧光 PCR 专用模板稀释液，在其余管中

加入 40 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 的猴端粒 DNA 阳性对照和 5 μL 1E7 拷贝/μL 的猴单基因 DNA 阳性对照，充分震荡 1 分钟，得端粒和单基因浓度均为 1E6 拷贝/μL 的联合标准曲线样品。放冰上待用。

3. 换枪头，在 5 号管中加入 5 μL 1E6 拷贝/μL 的阳性对照(上步稀释所得)，充分震荡 1 分钟，得两模板浓度均为 1E5 拷贝/μL 的联合标准曲线样品。放冰上待用。

4. 换枪头，在 4 号管中加入 5 μL 1E5 拷贝/μL 的阳性对照(上步稀释所得)，充分震荡 1 分钟，得两模板浓度均为 1E4 拷贝/μL 的联合标准曲线样品。放冰上待用。

5. 重复上面的操作直到得到 6 个稀释度的联合标准曲线样品。放冰上待用。

二、样本 DNA 制备

4. 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。

二、Probe qPCR 反应（20 μL 体系，在样品制备室进行）

5. 如果有 N 个样本，每个样本做 1 次重复，则标记 N+7 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	1-6 号 标曲样本管
2×Probe qPCR MasterMix	各 10 μL	10 μL	各 10 μL
猴端粒 qPCR 引物-探针混合液 (含内参引物探针)	4 μL	4 μL	4 μL
待测 DNA 样本	6 μL	不加	不加
超纯水	不加	6 μL	不加
联合标准曲线样品 1-6 号	不加	不加	各 6 μL（1 号样到 1 号管）

6. 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 FAM 和 Cy5 通道的荧光信号

	四、数据分析 7. 阴性阳性判断：每个反应均需要对 FAM 通道和 Cy5 通道结果分别进行判定，得到两个通道的结果。对某通道如果没有 Ct 读数，或 Ct 大于 40 判为此通道阴性。如果有 Ct 读数，Ct 值小于 40，荧光信号有对数增长，有典型扩增曲线，则判为此通道阳性。 8. 实验有效性判断：如果 6 个标准曲线结果为阴性则整个无效，不需要分析数据，需要分析失败原因。可能有操作、仪器和试剂三方面的原因，可重做扩增实验或跟仪器/试剂厂家联系。如果扩增阴性对照在两通道有一个结果为阳性，说明环境污染，则整个实验无效，不需要分析数据，需要查找失败原因，直到污染消除。如果上述结果正常，则分析样本的有效性。 9. 样本有效性判断：如果样本 FAM 通道的结果为阳性，则无论内参 Cy5 通道的结果是阴性还是阳性，样本的结果均有效。如果样本结果为阴性，内参通道结果也为阴性，则此样品的阴性结果无效。此样品需要重新提取核酸和进行扩增。 10. 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 FAM 通道的 Ct 值为纵轴，绘制标准曲线。再以待测样品 FAM 通道的 Ct 值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）。 11. 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 Cy5 通道的 Ct 值为纵轴，绘制标准曲线。再以待测样品 Cy5 通道的 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。 12. 由于猴一个细胞一般有 24 对（48 条）染色体，每条染色体有两个端粒，故一个细胞有 96 个端粒。如果 1 μL 中有 N 个细胞，则有 96N 个端粒。 13. 每个端粒的平均长度=端粒总拷贝数（来于第 10 步）/96N 端粒。
关联产品	人端粒绝对长度检测试剂盒（探针法 qPCR）