天净沙系列

CAT#:17-001rTL

低温运输，-20℃保存

天净沙

人端粒相对长度检测试剂盒（探针法 qPCR）

Human Relative 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，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. 一管式操作，只需要半天，比 Southern 杂交检测法快 3-5 天时间。
3. 通过比较同一个样本中端粒和内源单拷贝基因的 Ct 差值进行相对定量。
4. 提供人端粒/单基因 DNA Ct 比值确定的阳性对照。
5. 本产品足够 50 次 20 μL 体系的相对端粒长度探针法 PCR 反应。
6. 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
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 qPCR 引物-探针干粉（含内参引物探针）	yp17-001rTL	50 次	0.5 mL 白盖管
人端粒/单基因 DNA 阳性对照	pc15-001rTL	50 μL	0.5 mL 黄盖管
使用手册	sc17-001 rTL	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、样本 DNA 制备

1. 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。
2. 用自备 PicoGreen 法或测 OD 法精准定量样本 DNA。
3. 将样本 DNA 稀释到 10 ng/μL 的浓度待用。

二、Probe qPCR 反应（20 μL 体系，在样品制备室进行）

4. 如果有 N 个样本，每个样本做 1 次重复，则标记 N+2 个 PCR 反应管，N 个用于待测样本，1 个用于 NC（扩增阴性对照），1 个用于 PC（扩增阳性对照）。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	NC 管	PC 管
2×Probe qPCR MasterMix	各 10 μL	10 μL	10 μL
人端粒 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，10 ng/μL	6 μL	不加	不加
超纯水	不加	6 μL	不加
人端粒/单基因 DNA 阳性对照	不加	不加	6 μL

5. 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 通道和 Cy5 通道的荧光信号

四、数据分析

6. 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，并且荧光信号呈现对数增长，呈现典型的倒 S 扩增曲线，则判为此通道阳性。
7. 实验有效性判断：如果扩增阳性对照管的结果为阴性则整个实验无效，不需要分析数据，需要先分析失败原因。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，则继续分析样本的数据。
8. 样本有效性判断：如果样本 FAM 通道或 Cy5 通道任何一个为阴性，则此样品的数据无效，需要重新提取核酸和进行扩增。如果样本 FAM 通道和 Cy5 通道均为阳性（标准见第 6 步），则该样本数据有效，可以进行后续计算。
11. 根据 Livak 2^-ΔΔCt 法进行下列计算。
12. 如果每个待测样本做了 N 次重复，先计算其 FAM Ct 和 Cy5 Ct 平均值。
13. 计算每个样本得端粒ΔCt。样本端粒ΔCt=样本的 Cy5 Ct 平均值-该样本 FAM Ct 平均值。由于端粒得拷贝数多于单基因，故 FAM Ct 将小于 Cy5 Ct，差值

	将为正。 14. 计算每个待测样本所有重复的平均值，得样本端粒ΔCt 均值。 15. 按上法计算 PC ΔCt 均值。 16. 计算每个样本的ΔΔCt=样本端粒ΔCt 均值-PC ΔCt 均值。 17. 计算本次实验得参考ΔCt=NC ΔCt=NC 对照 FAM Ct-NC 对照 Cy5 Ct 18. 计算每个样本的端粒ΔΔCt。端粒ΔΔCt=样本端粒ΔCt-NC 对照ΔCt。 19. 则该/PC 的相对端粒长度（倍数）=2^-ΔΔCq，通过此公式即可计算出该样本的相对端粒长度。PC 的端粒长度为 XXXbp 重复。
关联产品	人端粒相对长度检测试剂盒（探针法 qPCR）