天净沙系列

CAT#:14-132-aTL
低温运输，-20℃保存

天净沙

小鼠端粒绝对长度检测试剂盒（染料法 qPCR）

Mouse Telomere Absolute Length SYBR qPCR Kit

使用手册 V0.50

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

本产品是小鼠端粒绝对长度的染料法 qPCR 检测试剂盒，它具有下列特点：

1. 即开即用，用户只需要提供纯化好的样品 DNA。
2. 产品经过精心优化，分析灵敏度高，可以达到 100 个 TTAGGG 拷贝/反应。
3. 提供小鼠端粒 DNA 阳性对照，用于制备标准曲线。
4. 提供小鼠单基因 DNA 阳性对照，用于在起始样本细胞数未知时进行数据归一化处理。
5. 特异性高，引物专门根据小鼠端粒设计，不会跟小鼠其他基因发生交叉反应。
6. 分辨率高，能检测出检测限之上 10 个 TTAGGG 拷贝数的差异。
7. 基于标准曲线的绝对定量，而非基于ΔΔCt 的相对定量。定量检测线性范围至少为 5 个数量级。。
8. 本产品足够 50 次 20 μL 体系的小鼠端粒绝对长度染料法 qPCR 反应和 50 次 20 μL 体系的小鼠单基因染料法 qPCR 反应。
9. 本产品只能用于科研。

规格及成分

本产品采用十孔盒包装

成分	编号	规格	包装
预处理液 A	14-132-aTL-a	50 μL	0.5 mL 绿盖管
预处理液 B	14-132-aTL-b	50 μL	0.5 mL 绿盖管
2×SYBR qPCR MasterMix V2	990408v2	1 mL	1.5 mL 棕色管
荧光 PCR 专用模板稀释液	180701	1 mL	1.5 mL 绿盖管
小鼠端粒 PCR 引物冻干粉	yw132-aTL	50 T	0.5 mL 棕色管
小鼠单基因 PCR 引物冻干粉	yw132-X	50 T	0.5 mL 棕色管
小鼠端粒阳性对照冻干粉	pc132-TL	50 T	0.5 mL 黄盖管
小鼠单基因阳性对照冻干粉	pc132-x	50 T	0.5 mL 黄盖管
小鼠基因组 DNA 溶液	220888	100 μL	0.5 mL 白盖管
超纯水	210806	1 mL	1.5 mL 蓝盖管
使用手册	17-132-aTL-sc	1 份	无

运输及保存

低温运输，-20℃保存，保存期限为 12 个月。

自备试剂

样品 DNA，超纯水，核酸纯化试剂盒。

使用方法

方案 1：若起始样本（如实体组织，切片等）的细胞数量未知，则采用本方案

一、 首次使用本试剂盒时，需要制备下列溶液。

1. 配制两种引物混合液：将 55 μL 超纯水加入到装有小鼠端粒 PCR 引物冻干粉的管中，涡旋震荡混匀 30 秒即得端粒引物混合液。将 55 μL 超纯水加入到装有小鼠单基因

PCR 引物冻干粉的管中，涡旋震荡混匀 30 秒即得单基因引物混合液。放冰上待用。没用完的需存-20℃。

2. 配制端粒 PC 溶液：将 55 μL 超纯水加入到装有小鼠端粒阳性对照冻干粉的管中，涡旋震荡混匀 30 秒即得浓度为 1E9 拷贝/μL 的小鼠端粒 PC 溶液。放冰上待用。没用完的需存-20℃。
3. 配制单基因 PC 溶液：将 55 μL 超纯水加入到装有小鼠单基因阳性对照冻干粉的管中，涡旋震荡混匀 30 秒即得浓度为 1E7 拷贝/μL 的端粒 PC 溶液。放冰上待用。没用完的需存-20℃。

二、制备小鼠端粒标准曲线梯度稀释液（Serial Dilution of Standard Curve，SDSC。一下简称 SDSC。由于本产品以 TTAGGG 为单位计算拷贝数，而每个细胞最少有 3000 拷贝以上的 TTAGGG，故本手册将标曲范围设置在 1E3-1E8 拷贝/μL 之间）。

4. 标记 6 个离心管，分别为 A8、A7、A6、A5、A4、A3。
5. 用带芯枪头分别加入 45 μL 荧光 PCR 专用模板稀释液，最好用带芯枪头，下同）。
6. 在 A8 号管中加入 5 μL 1E9 拷贝/μL 的端粒 PC 溶液（来于第 2 步），充分震荡 1 分钟，得 1E8 拷贝/μL 的端粒 SDSC。放冰上待用。
7. 换枪头，在 A7 号管中加入 5 μL 1E8 拷贝/μL 的端粒 SDSC（来于上步），充分震荡 1 分钟，得 1E7 拷贝/μL 的端粒 SDSC。放冰上待用。
8. 换枪头，在 A6 号管中加入 5 μL 1E7 拷贝/μL 的端粒 SDSC（来于上步），充分震荡 1 分钟，得 1E6 拷贝/μL 的端粒 SDSC。放冰上待用。
9. 重复上面的操作直到得到 1E3-1E8 拷贝/μL 6 个稀释度的端粒 SDSC。

二、制备小鼠单基因 SDSC

10. 标记 6 个离心管，分别为 6、5、4、3、2、1。
11. 用带芯枪头分别加入 45 μL 荧光 PCR 专用模板稀释液，最好用带芯枪头，下同）。
12. 在 6 号管中加入 5 μL 1E7 拷贝/μL 的单基因 PC 溶液（来于第 3 步），充分震荡 1 分钟，得 1E6 拷贝/μL 的单基因 SDSC。放冰上待用。
13. 换枪头，在 5 号管中加入 5 μL 1E6 拷贝/μL 的单基因 SDSC（来于上步），充分震荡 1 分钟，得 1E5 拷贝/μL 的单基因 SDSC。放冰上待用。
14. 换枪头，在 4 号管中加入 5 μL 1E5 拷贝/μL 的单基因 SDSC（来于上步），充分震荡 1 分钟，得 1E4 拷贝/μL 的单基因 SDSC。放冰上待用。
15. 重复上面的操作直到得到 6 个稀释度的单基因 SDSC。放冰上待用。

三、样品 DNA 的制备

16. 若有 N 个样品，最好设置 N+2 个提取，多出的一个是 PNC（制备阴性对照，

Preparation Negative Control，用确认不含小鼠端粒 DNA 的材料作为制备的起始样本，可以用水替代），另一个是 PPC（制备阳性对照，Preparation Positive Control，用端粒长度已确认的小鼠材料作为制备的起始样本）。

17. 用自选方法制备 N + 2 个样品的基因组 DNA 并测定其浓度，详细记录起始细胞数）如果有的话），制备的 DNA 体积和浓度。本试剂盒跟市场上大多数 DNA 制备试剂盒兼容。注意：须用同一类型细胞而不是混合细胞制备 DNA，因为细胞类型不同，其细胞分裂次数不同，端粒长度也不同，导致样本内差异完全可能大于样本间差异，使得样本间的比较失去意义。

三、PCR 预处理及扩增（20 μL 体系，在样品制备室进行）

18. 计算反应数：推荐每个样本做 3 次重复，得到 3 个端粒绝对长度，然后计算平均值。但为方便描述，本手册以 N 个待测样本，每个（包括 SDSC 样本）做 1 次重复为例。若所作重复数不是 1 个，各试剂用量需自行调整。

19. 设置端粒检测反应：标记 N + 10 个 PCR 管，其中 N + 2 个用于上步得到的 N + 2 个样品，2 个分别用于 ANC（Amplification Negative Control，扩增阴性对照）和 APC（Amplification Positive Control，扩增阴性对照），6 个用于端粒 SDSC。按下表加各成分：

成分	N + 2 个样品管	ANC	APC	6 个端粒 SDSC 管
N + 2 个样本（第 16 步）	各 5 μL	不加	不加	不加
超纯水	不加	5 μL	不加	不加
小鼠基因组 DNA 溶液	不加	不加	5 μL	不加
6 个端粒 SDSC（第 9 步）	不加	不加	不加	各 5 μL
预处理液 A	各 1 μL	1 μL	1 μL	各 1 μL

20. 设置单基因检测反应：

成分	N+2 个样品管	ANC	APC	6 个单基因 SDSC 管
N+2 个样本（第 16 步）	各 5 μL	不加	不加	不加
超纯水	不加	5 μL	不加	不加
小鼠基因组 DNA 溶液	不加	不加	5 μL	不加
6 个单基因 SDSC（第 15 步）	不加	不加	不加	各 5 μL
预处理液 A	各 1 μL	1 μL	1 μL	各 1 μL

21. 预处理：将上两步所有反应管放 PCR 仪中（不得使用水浴或金属浴），95℃ 10 分钟，50℃ 30 分钟，16℃ 5 分钟。然后各加入 1 μL 预处理液 B，16℃ 60 分钟，70℃ 20 分钟，4℃ 待用。

22. PCR 反应：在端粒检测的 N+10 个反应管中各加入 1 μL 端粒引物混合液（第 1 步），在单基因检测的 N+10 个反应管中各加入 1 μL 单基因引物混合液（第 1 步），最后在所有管中加入 10 μL 2×SYBR qPCR MasterMix V2，轻柔混匀后上机进行 PCR。PCR 参数如下：

过程	温度	时间
预变性	95℃	10 min
PCR 反应 （45 个循环）	95℃	15 sec
	60℃	30 sec （采集 SYBR 通道的荧光信号）
溶解曲线分析		按仪器厂家流程进行

四、数据处理

23. 判读每个反应的数据。

分类	PCR 结果	判读
端粒检测	有倒 S 型扩增曲线，Tm 为 XX℃	阳性
	有倒 S 型扩增曲线，Tm 非 XX℃	阴性
	无倒 S 型扩增曲线或无 Tm	阴性
单基因检测	有倒 S 型扩增曲线，Tm 为 XX℃	阳性
	有倒 S 型扩增曲线，Tm 非 XX℃	阴性
	无倒 S 型扩增曲线或无 Tm	阴性

24. 实验有效性判断：端粒检测和单基因检测为两个独立实验，故需要独立判断各自的有效性。若 PPC 或/和 APC 结果为阴性，则整个实验无效，不需要分析数据，需要重新进行整个实验或跟厂家联系。若 PNC 或/和 ANC 结果为阳性，说明环境污染，则整个实验无效，需要重新进行整个实验或跟厂家联系。若每个独立实验的 4 个对照均正常，则此实验有效，可以进入后续分析。

25. 计算样本的起始细胞数：由于起始细胞数未知，故需要通过单基因检测结果推算。以单基因 SDSC 浓度的 log 值为横轴，以 Ct 值为纵轴，绘制标准曲线，得到线性回归方程式。再将待测样品单细胞检测的 Ct 值代入即可计算出样品中单基因拷贝数/μL 的 log 值，再将 log 值换成拷贝/μL 即得浓度，浓度×体积（第 17 步）即得单基因拷贝数。若起始样本是数量未知的体细胞，由于每个体细胞有两个单基因，上步所得总拷

贝数/2 即为起始细胞数。若起始样本是单倍体细胞（精细胞，卵细胞），每个细胞只有一个单基因，上步所得总拷贝数/1 即为该样本起始细胞数。

26. 计算待测样本中 TTAGGG 的拷贝数和长度：以端粒 SDSC 浓度的 log 值为横轴，以 Ct 值为纵轴，绘制标准曲线，得到线性回归方程式。再将待测样品的 Ct 值代入即可计算出样品 TTAGGG 拷贝数/μL 的 log 值，再将 log 值换成拷贝/μL 即得浓度，浓度×体积（第 17 步）即得 TTAGGG 拷贝数，再乘 6 bp/拷贝即得长度。
27. 计算每个细胞的 TTAGGG 拷贝数和长度：将第 25 步根据单基因检测所推算出的起始细胞数代入公式 TTAGGG 拷贝数/起始细胞数即得每个细胞的 TTAGGG 拷贝数，再乘 6 bp/拷贝即得长度。
28. 计算每条染色体的平均 TTAGGG 拷贝数和长度：若起始样本是体细胞，每个细胞含 40 条染色体，每条染色体的平均 TTAGGG 拷贝数 = 每个细胞的 TTAGGGG 拷贝数/40，再乘 6 bp/拷贝即得长度。若起始样本是单倍体细胞（精细胞，卵细胞），每个细胞含 20 条染色体，每个细胞的 TTAGGGG 拷贝数/40，再乘 6 bp/拷贝即得长度。
29. 计算每个端粒的平均 TTAGGG 拷贝数和长度：每条染色体有两个端粒，故上步所得染色体平均 TTAGGG 拷贝数/2 即得每个端粒的平均 TTAGGG 拷贝数，再乘 6 bp/拷贝即得长度。
30. 本试剂盒提供的此批次的小鼠基因 DNA 每个端粒平均有 TTAGGG 个拷贝，平均长度是 XXX bp。

方案 2：若起始样本（如培养细胞，血液细胞等）的细胞数量已知，则采用本方案

31. 第 1 步到第 24 步的操作同方案 1，只是在 DNA 制备实验前需要对起始材料进行准确的细胞计数，并跳过所有跟单基因检测有关得操作。
32. 计算待测样本 DNA 中 TTAGGG 的拷贝数和长度：以端粒 SDSC 浓度的 log 值为横轴，以 Ct 值为纵轴，绘制标准曲线，得到线性回归方程式。再将待测样品的 Ct 值代入即可计算出样品 TTAGGG 拷贝数/μL 的 log 值，再将 log 值换成拷贝/μL 即得浓度，浓度×体积（第 17 步）即得 TTAGGG 总拷贝数，再乘 6 bp/拷贝即得长度。
33. 计算每个细胞的 TTAGGG 拷贝数和长度：将第 31 步所得起始细胞数代入公式 TTAGGG 总拷贝数/起始细胞数即得每个细胞的 TTAGGG 拷贝数，再乘 6 bp/拷贝即得长度。
34. 计算每条染色体的平均 TTAGGG 拷贝数和长度：若起始样本是体细胞，每个细胞含 40 条染色体，每条染色体的平均 TTAGGG 拷贝数 = 每个细胞的 TTAGGGG 拷贝

	数/40，再乘 6 bp/拷贝即得长度。若起始样本是单倍体细胞（精细胞，卵细胞），每个细胞含 20 条染色体，每个细胞的 TTAGGGG 拷贝数/40，再乘 6 bp/拷贝即得长度。 35. 计算每个端粒的平均 TTAGGG 拷贝数和长度：每条染色体有两个端粒，故上步所得染色体平均 TTAGGG 拷贝数/2 即得每个端粒的平均 TTAGGG 拷贝数，再乘 6 bp/拷贝即得长度。 36. 本试剂盒提供的此批次的小鼠基因 DNA 每个端粒平均有 TTAGGG 个拷贝，平均长度是 XXX bp。
关联产品	人端粒绝对长度探针法 qPCR 试剂盒