天净沙系列

CAT#:15-132-aTL

低温运输，-20℃保存

天净沙

小鼠端粒绝对长度检测试剂盒（探针法 qPCR）

Mouse Telomere Absolute Length Probe 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

本产品是用于检测小鼠端粒绝对长度的探针法 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. 引物和探针经过优化，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. 提供小鼠单基因对照。
5. 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。
6. 特异性高，引物探针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
7. 分辨率高，能检测出 10 个 TTAGGG 拷贝数的差异。
8. 定量检测线性范围至少为 5 个数量级。
9. 本产品足够 50 次 20 μL 体系的小鼠端粒绝对长度探针法 qPCR 反应和 50 次 20 μL 体系的小鼠单基因探针法 qPCR 反应。
10. 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	15-132-aTL-a	50 μL	0.5 mL 绿盖管
预处理液 B	15-132-aTL-b	50 μL	0.5 mL 绿盖管
2×Probe qPCR MasterMix V3.0	981201v3.0	0.5 mL ×2	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
小鼠端粒 qPCR 引物-探针冻干粉	yp132-aTL	50 T	0.5 mL 棕色管
小鼠单基因 qPCR 引物-探针冻干粉	yp132-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	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 yp 混合液：将 55 μL 超纯水加入到装有小鼠端粒 qPCR 引物-探针冻干粉的

管中，涡旋震荡混匀 30 秒即得端粒 YP 混合液。将 55 μL 超纯水加入到装有小鼠单基因 qPCR 引物-探针冻干粉的管中，涡旋震荡混匀 30 秒即得单基因 YP 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（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（来于第 2 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 NC（Preparation Negative Control，制备阴性对照，用确认不含小鼠端粒的样本作为起始材料，可以用水替代），另一个是 PPC（Preparation Positive Control，制备阳性对照，用端粒长度已确认的样本作为起始材料）。
17. 用自选方法纯化样品的基因组 DNA。本试剂盒跟市场上大多数 DNA 提取试剂盒兼容。注意：须用同一类型细胞而不是混合细胞进行 DNA 提取，因为细胞类型不同，其细胞分裂次数不同，端粒长度也不同，样本内的差异完全可能大于样本间的差异，使得比较没有意义。

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，然后取平均值。但为方便描述，下列操作以 N 个待测样本，1 个样本（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 个分别用于扩增阴性对照（Amplification Negative Control，ANC）和扩增阴性对照（Amplification Positive Control，APC），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	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	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，冰上放置。

22. PCR 反应：在端粒检测的 N+10 个反应管中各加入 1 μL 端粒 YP 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 YP 混合液（第 1 步），然后在所有管中加入 10 μL 2×Probe qPCR MasterMix v3，轻柔混匀后上机进行 qPCR。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 FAM 通道的荧光信号，设置 TAMRA 为淬灭基团）

四、数据处理

23. 判断每个数据点的结果判断。

信号通道	判断标准	结果
FAM	Ct 值小于 40 且扩增曲线呈倒 S 型	FAM 阳性
	Ct 值大于等于 40	FAM 阴性
	无 Ct 值	FAM 阴性
Cy5	Ct 值小于 40 且扩增曲线呈倒 S 型	Cy5 阳性
	Ct 值大于等于 40	Cy5 阴性
	无 Ct 值	Cy5 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的数据计算。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。再将待测样品的 Ct 值代入即可计算出样品单基因拷贝数/μL 的 log 值，再将 log 值换成拷贝/μL 即得浓度，浓度×DNA 总体积即得单基因总拷贝数。若起始样本是数量未知的小鼠体细胞，每个细胞有两个拷贝单基因，上步所得总拷贝数/2 即可

推出为该样本起始细胞数。若起始样本是小鼠单倍体细胞（精细胞，卵细胞），每个细胞只有 1 拷贝单基因，上步所得总拷贝数/2 即可推出为该样本起始细胞数。N 个样本将得到 N 个数据。

26. 计算待测样本 DNA 中 TTAGGG 的总拷贝数和长度：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×DNA 总体积即得 TTAGGG 总拷贝数，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 步计算的起始细胞数代入公式 TTAGGG 总拷贝数/起始细胞数即得，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：若起始样本是小鼠体细胞，每个细胞染色体总数是 40 条，上步所得每个细胞的 TTAGGGG 总拷贝数/40 染色体即得每条染色体的平均 TTAGGG 拷贝数，再乘 6 bp/拷贝即得长度。若起始样本是小鼠单倍体细胞（精细胞，卵细胞），每个细胞染色体总数是 20 条，上述计算需相应调整。
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，故上步所得数值/2 即得每个端粒的平均 TTAGGG 拷贝数和长度。
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，只是跳过所有跟小鼠单基因检测有关得操作。
32. 计算待测样本 DNA 中 TTAGGG 的总拷贝数和长度：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×DNA 总体积即得 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 17 步记录的起始细胞数代入公式 TTAGGG 总拷贝数/起始细胞数即得，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：若起始样本是小鼠体细胞，每个细胞染色体总数是 40 条，上步所得每个细胞的 TTAGGGG 总拷贝数/40 染色体即得每条染色体的平均 TTAGGG 拷贝数，再乘 6 bp/拷贝即得长度。若起始样本是小鼠单倍体细胞（精细胞，卵细胞），每个细胞染色体总数是 20 条，上述计算需相应调整。
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，故上步所得数值/2 即得每个端粒的平均 TTAGGG 拷贝数和长度。

	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 qPCR 试剂盒

20251109dx