天净沙系列

CAT#:14-001rTL

低温运输，-20℃避光保存

天净沙

人端粒相对长度检测试剂盒（染料法 qPCR）

Human Relative Telomere Length Detection Kit（SYBR qPCR）

使用手册 V0.8

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（Telomere）是由多个重复核苷酸元件（TTAGGG）所串联组成的一段真核细胞染色体末端的 DNA 序列，除了提供非转录 DNA 的缓冲物外，还能保护染色体末端免于融合和退化，保护染色体结构稳定和遗传完整。端粒是一个人老化速度的最重要和准确的指标，它的初始长度由遗传和环境因素决定，并且会随着时间的推移而减少。有研究表明，端粒长度与 DNA 修复、衰老、细胞凋亡及肿瘤发生等有密切的联系，因此，对于研究人员来说，准确而可重复地测量端粒长度尤为重要。本产品主要采用相对定量 qPCR 来直接比较样本的平均端粒长度，即采用端粒重复序列（Tel）的拷贝数与基因组单拷贝基因（SCR）的相对拷贝数比值（T/S）作为端粒相对长度。单拷贝基因引物(SCR)特异性识别并扩增人类 11 号染色体上 78 bp 长的区域。它具有下列特点：

1. 即开即用，快速获得结果，可节省多达 50%的时间。
2. 优化的即用型预混液用于快速 PCR 反应，且预混液中的 SYBR Green I 染料可分析多个目标核酸，无需合成序列特异性探针。
3. 高效可靠的定量，准确检测各种起始量的模板，扩增稳定、定量结果具有高度重复性。
4. 无非特异性扩增。每组引物均已经过扩增曲线效率验证（E>98%，R2>0.99），熔解曲线分析以及凝胶电泳验证。
5. 使用 PCR 扩增，几乎每个分子生物学实验都有相关设备，非常方便。
6. 抗体法热启动 Taq 酶可以有效抑制引物非特异性退火导致的扩增,同时优化了 PCR 配方，适合低浓度模板的扩增，使定量 PCR 可以在宽广的定量区域内获得良好的标准曲线。
7. 本产品足够 100 次/50 样（一次重复）的染料法荧光定量 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×染料法 qPCR MasterMix	990408	1 mL	1.5 mL 本色管
50× Rox 染料	220118	250 μL	1.0 mL 棕色管
无核酸酶双蒸水	251103	1 mL	1.5 mL 本色管
10 μM 端粒基因引物	yw230431a	50 μL	0.5 mL 本色管
10 μM 单拷贝基因引物	yw230431b	50 μL	0.5 mL 本色管
使用手册	14-001rTL sc	1 份	无

运输及保存

低温运输，-20℃保存，保存期限为一年。

自备试剂	基因组 DNA
使用方法	**一、反应体系** 建立如下所述的反应体系。若要进行多个反应，可制备通用组分的预混液，在每管或每孔中加入合适的体积，然后加入特殊的反应组分（例如：模版）

成分	使用量	终浓度
2×染料法 qPCR MasterMix	10 μL	1×
10 μM 端粒基因引物 或 10 μM 单拷贝基因引物	0.4 μL	0.2 μM
基因组 DNA	0.5~5 ng	
*50× ROX 染料（可选）	0.4 μL	1×
无核酸酶双蒸水	补足剩余至 20 μL	——

1. 推荐使用 20 μL 体系以保证目的基因扩增的有效性和重复性。
2. 盖上或密封反应管/PCR 板，轻轻混匀。可以稍微离心，确保所有组分都在管底。
3. 将反应体系置于荧光定量 PCR 仪中，收集数据并分析结果。按下表所示设置您的 PCR 仪。最适温度和孵育时间可视具体情形而定。

***ROX 染料**

可根据选择的仪器在反应体系中加入 ROX 染料，将反应体系中的荧光信号标准化。下表所列为使用不同仪器操作时所需的 ROX 量（每 50 μL 反应体系）：

仪器	每 50 μL 体系反应所需的 ROX 量
ABI7300、7900HT、StepOne 等	5 μL
ABI7500、7500Fast、ViiA7、 Stratagene Mx3000™、Mx3005P™ 以及 Mx4000 等	1 μL
Roche 仪器、Bio-Rad 仪器， Eppendorf 仪器等	无需添加

4. 三步法扩增程序：

过程	温度	时间
预变性	95℃	3 min
PCR 反应 (35-40 个循环)	95℃	5 sec
	58℃	30 sec
	72℃	30 sec
溶解曲线分析		按 qPCR 仪器手册执行

	注：决定最佳退火温度的主要因素为引物长度及引物碱基组成。根据试剂盒端粒及 SCR 引物组的特性，我们建议退火温度设置为 58℃。 **二、结果分析** 5. 定量实验至少需要三组单拷贝基因（SCR）样本以及对应的端粒重复序列（Tel），每种样本至少需要三个生物学重复。反应结束后需要确认扩增曲线及熔解曲线。计算时设定其中一组样本为对照组，其他样本则为实验组。 6. 荧光定量 PCR 检测之后得到基因组单拷贝基因（SCR）和用端粒重复序列（Tel）的的 Ct 值，使用ΔΔCt 法计算实验组与对照组的相对拷贝数 T/S 比率（T/S ration）： T/S ration = 2^-ΔΔCt。 ΔCt = Tel – SCR，ΔΔCt = ΔCt 实验 – ΔCt 对照。 由于相对 T/S 比率同端粒长度成正比关系，因此可以通过相对 T/S 比率来反应端粒的相对长度。 **三、注意事项：** 7. 基因组 DNA：在 20 μL 体系里可使用 0.5 ng 至 5 ng 量的基因组 DNA。 8. 为了您的安全及健康，实验操作时请穿实验服并佩戴一次性操作手套。 9. 本品含有荧光染料 SYBR Green I，保存或配制反应体系时需避免强光照射，使用前请务必颠倒混匀。
关联产品	人端粒酶活性检测试剂盒（qPCR 法）