天净沙系列

CAT#:17-001aTL

低温运输，-20℃保存

天净沙

人端粒绝对长度检测试剂盒（探针法 qPCR）

Human Absolute Telomere Length Assay（Probe qPCR）

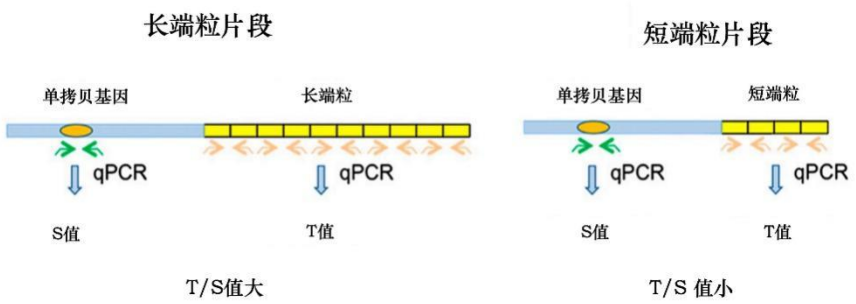
使用手册 V0.8

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）是指真核细胞染色体末端独特的蛋白质-DNA 结构,人类端粒由 TTAGGG 重复串联构成，长度为 5～15 kb。端粒对于染色体的稳定非常重要，其主要通过防止染色体降解及端端融合来维护染色体的稳定和功能。细胞每次分裂端粒减少 20～200 bp，直到达到关键长度，此时细胞步入老化阶段。因此，外周血白细胞的端粒长度与年龄呈负相关，因此快速检测端粒长度具有重要的意义。本产品是以荧光定量 PCR 技术为基础开发的专门检测人端粒长度的试剂盒，它能比较两个样本端粒的相对长度。其原理是先测定出每个样本中的端粒拷贝数 T 和单拷贝内参基因的拷贝数 S，然后计算出其比值 T/S，通过比较该比值大小来计算两个比较样本中端粒的相对长度。本法原理示意图如下：



它具有下列特点：

1. 即开即用，用户只需要提供外周血 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. 端粒长度检测更加可靠。端粒与内参单管检测 ，减少孔间干扰。内参基因为多拷贝 ，与端粒量差降低。
4. 端粒长度计算更加准确。引入已知端粒绝对长度的标准品和校正品，一个用于构建标准曲线，一个用于校正 ，可同时获得样品的相对长度（T/S）和绝对长度。
5. 本产品只能用于科研。

规格及成分

本产品第一部分，编号 17-001aTL pt1，五孔盒包装，低温运输，4℃保存

名称	编号	规格	包装
DNA 纯化液	17-001aTL a	250 μL×2 管	1.5 mL 绿盖管
DNA 分选磁珠	17-001aTL b	750 μL×2 管	1.5 mL 绿盖管
使用手册	17-001aTL sc	1 份	无

本产品第二部分，编号 17-001aTL pt2，十孔盒包装，低温运输，-20℃保存

名称	编号	规格	包装
标准品	17-001aTL c	冻干粉×1 管	1.5 mL 蓝盖管

校正品	17-001aTL d	冻干粉×1 管	1.5 mL 绿盖管
qPCR Master Mix	17-001aTL e	780 μL×1 管	1.5 mL 本色管
引物、探针干粉	yw17-001aTL	冻干粉×1 管	1.5 mL 棕盖管
石蜡油	17-001aTL f	500 μL×1 管	1.5 mL 本色管
RNase-Free Water	17-001aTL g	1 mL×1 管	1.5 mL 绿盖管
使用手册	17-001aTL sc	1 份	无

运输及保存

低温运输，DNA 纯化液及 DNA 分选磁珠 4℃保存，其他组份-20℃保存。保存期限为 6 个月。

自备试剂

样品 DNA、无水乙醇、TE 洗脱液。

使用方法

一、DNA 纯化步骤：DNA 前处理

1. 标准品和校正品先进行 12000 rpm 离心 5 min，离心后小心开启，每管再分别用 66 μL RNase Free Water 复溶。使用时请上下轻柔颠倒十次混匀，避免起泡，并低速短暂离心后使用。
2. 引物、探针干粉先 12000 rpm 离心 5 min，再用 517 μL RNase-Free Water 复溶，得到引物、探针混合液。
3. 各试剂使用前请上下轻柔颠倒十次混匀，后低速离心、小心开启。避免起泡。
4. 1 μg DNA 样本或 20 μL 标准品/20 μL 校正品中加入 10 μL DNA 纯化液并混匀，37℃金属浴 30 min，90℃金属浴 2 min。

二、DNA 纯化步骤：DNA 磁珠分选

5. 将磁珠由 2-8℃中取出，室温平衡至少 30 min。涡旋震荡或充分颠倒磁珠以保证混匀；
6. 根据要求向含有样本的离心管内加入 30 μL 磁珠悬液，涡旋混匀(或使用移液器小心吹打 10 次)；
7. 室温静置 5 min；
8. 室温 12000 rpm 离心 30 s（该步骤可以加速聚集磁珠，可选）；
9. 将离心管置于磁力架上至溶液完全澄清（约 1 min），弃去上清；
10. 保持离心管固定于磁力架上，加入 200 μL 80%乙醇，静置 1 min，无需重悬磁珠，弃去上清（保持离心管固定于磁力架上）；重复该操作一次；
11. 保持离心管置于磁力架上，静置通风 2-5 min 除醇；

    注:除醇过程中请勿过分干燥磁珠，否则会降低纯化效率；
12. 将离心管从磁力架上取下，加入 30 μL TE 洗脱液洗脱，涡旋混匀(或使用移液器小心

吹打 10 次);

13. 室温静置 5 min;

14. 室温 12000 rpm，离心 30 s（该步骤可以加速聚集磁珠，可选）；

15. 将离心管置于磁力架上至溶液完全澄清（约 1 min），待磁珠完全吸附后将上清转移至新样品管中备用。

三、标准品和校正品准备

16. 标准品质量的标化：标准品 DNA 和校正品 DNA 经 DNA 纯化液纯化后，用 DNA 分选磁珠进行分选，具体步骤见二。

17. 校正品稀释：DNA 磁珠分选后的校正品中的 DNA 标化为 4 ng/μL，体积为 20 μL。

18. 标准品浓度稀释：DNA 磁珠分选后的标准品中的 DNA 标化为 8 ng/μL，体积为 40 μL（标为管 1）， 用 RNase-Free Water 进行 2 倍梯度稀释得到管 2、管 3。

    注：从管 1 中吸取 20 μL，加入到管 2 中，另外加入 20 μL RNase-Free Water 得到溶液 2；在管 3 中加入 20 μL 溶液 2，另外加入 20 μL RNase-Free Water 得到溶液 3。连续的稀释方法得到标准曲线 R2 可达到 0.99 左右。

四、样本准备：样品前处理

19. 血液样本：血液样本建议在－20℃保存，本试剂盒支持从淋巴细胞中分选的白细胞或血液经红细胞裂解液处理分选的白细胞进行核酸抽提。

20. 细胞样本：建议采用我司的血液/细胞/组织基因组 DNA 提取试剂盒抽提 DNA，用于后续端粒长度的检测。

21. 唾液样本：唾液样本需要细胞分选再抽提 DNA，分选操作较复杂，建议咨询本公司技术人员。

五、样本准备：样本质量的标化

22. 端粒长度的测定与样本质量相关性较大，DNA 质量要求较高，需要对样本及标准品 DNA 纯化，保证样本的均一化。样本 DNA 经 DNA 纯化液处理（37℃金属浴 30 min，90℃金属浴 2 min）后，可根据样品的质量分别采用磁珠分选或割胶回收的方法，具体参考如下:

23. 磁珠分选方法：经 DNA 纯化液纯化后，如果样本 DNA 质量较好，采用磁珠分选方法。详细纯化 DNA 过程见步骤二。

24. 割胶回收方法：经 DNA 纯化液纯化后，如果样本 DNA 质量较差，采用割胶回收方法。具体操作：取 1 μg 样本进行 0.7-0.8%琼脂糖凝胶电泳后，使用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒回收纯化 DNA 片段，回收效率 10%-30%，和基因组 DNA 的完整程度有关。

六、样本浓度的标化：标准曲线法

25. 经磁珠分选的样本 DNA 浓度标化至 4 ng/μL，上样 5 μL。标准品的 DNA 浓度标化至 8 ng/μL，按 2 倍和 4 倍梯度稀释后，上样 5 μL，用于构建标准曲线（3 个梯度的 DNA 总上样量分别为 40 ng、20 ng、10 ng）。校正品的 DNA 浓度标化至 4 ng/μL，上样 5 μL，用于校正。连续的稀释方法得到标准曲线 R2 需达到 0.99 以上。
26. 经割胶回收的样本、标准品和校正品浓度标化方法同上。

    注：样品及标准品的浓度过高或过低会影响扩增效率，对实验造成干扰，测量结果误差较大。

七、SYBR qPCR 反应（45 μL 体系，在样品制备室进行）

27. 在反应管中按下表加入各成分（操作需全程在冰上进行）：

成分	样品管	校正品	标准曲线样品（1-3 管）
qPCR Master Mix	各 15.6 μL	15.6 μL	各 15.6 μL
引物、探针混合液	各 9.4 μL	9.4 μL	各 9.4 μL
待测 DNA 样本	各 5 μL	不加	不加
第 17 步所得校正品稀释液	不加	5 μL	不加
第 18 步所得标准曲线样品稀释液（1-3 号）	不加	不加	各 5 μL

注：可以先将 qPCR Master Mix、引物、探针混合液先混合，25 μL 分装。向已分装过 qPCR Mix 的反应管中加入 15 μL 石蜡油。向反应管中穿过石蜡油层加入样品，短暂离心后进行 qPCR。盖上八联管盖或者光学膜后盖上反应管盖子或者贴上光学膜，为避免影响荧光信号读取，请注意不要在管盖或者膜上做标记，或者用刮板反复摩擦。

28. 盖上盖子后上机，按下面参数进行 qPCR:

过程	温度	时间
预变性	95℃	2 min
PCR 反应（30 个循环）	95℃	15 sec.
	50℃	1 min
	72℃	45 sec.
50℃退火时收集荧光信号		
通道选择：样本检测通道-SYBR Green（FAM）；内参检测通道-VIC		

八、阈值设定：

29. 基线设置在 2-7 个循环。

	30. 阈值的设定要保证样本及标准品的 3 重复的△Ct 在 0.3 以内。 31. 阈值设定：内参和端粒扩增曲线阈值拉同一根线，都定为 700；40 ng 标准品端粒的 Ct 值定为 13±1，内参的 Ct 值定为 18±1；标准品端粒和内参的△Ct 为 5±0.5。 32. 阈值设置以后，标准品 3 个浓度梯度之间呈现较好的 Ct 差异，端粒通道和内参通道的△Ct 均在 0.8 左右。 33. 根据标准品标准曲线，若 R2＜0.99，表明操作有误。 **九、数据处理:** 34. 标准曲线的构建：以标准品 3 个浓度梯度下的平均 Ct 值为横坐标（x），3 个梯度的 Log2 浓度为纵坐标（y），构建标准曲线。 35. 利用标准品标准曲线计算校正品的 T/S：将校正品的端粒和内参通道的 Ct 值代入标准曲线方程 x，即可得到 y 值，则各得相对上样量为 2^y，即可得校正品的 T/S（端粒相对上样量/内参相对上样量）。 36. 利用标准品标准曲线计算样本的 T/S：将样本的端粒和内参通道的 Ct 值代入标准曲线方程，即可得到 y 值，则各得相对上样量为 2^y，即可得到样本的 T/S（端粒相对上样量/内参相对上样量）。 37. 校正系数的计算：已对标准品和校正品的端粒长度做 TRF 检测，绝对端粒长度已知（假定标准品的绝对长度为 5430 bp，校正品的绝对长度为 5100 bp），则 qPCR 法校正品测定端粒长度已知（如 5430*校正品的 T/S=校正品测定值），即可用于校正品的校正系数 T/S 的计算，为 5100/校正品测定值=校正系数 T/S。 38. 样本端粒绝对长度的计算: 样本端粒绝对长度=样本 T/S*校正系数 T/S*标准品绝对长度（5430 bp）
注意事项	1. 为了您的安全和健康，请穿戴实验服、口罩，并戴手套操作； 2. 本试剂盒提供试剂，使用前先低速离心后小心开启。使用时请上下轻柔颠倒十次混匀，避免起泡，并低速短暂离心后使用。 3. 磁珠悬液严禁冷冻、离心，第一次使用前需充分涡旋混匀； 4. 进行DNA片段分选时，建议样本体积≥50 μL，若样本体积不足50 μL请用 RNase-Free Water 补足； 5. 磁珠使用前须提前半小时取出，平衡至室温； 6. 任何过程中严禁磁珠过分干燥，否则会降低洗脱效率； 7. 80%乙醇需现用现配，否则将影响回收效率。 8. 标准品、校正品的绝对长度，请咨询北京天净沙基因科技有限公司。产品批次不同，绝对长度会有差异。

	9. 样品及标准品浓度过高或过低会影响扩增效率，对实验造成干扰，测量结果误差较大。
关联产品	人端粒酶活性检测试剂盒（qPCR 法）