



GenePharma

Custom gene qRT-PCR Quantitation Kit

**For the detection and quantification of
mRNAs using real-time RT-PCR
detection instruments**

**User Manual
Version 1406**

介绍

产品简介

本产品为客户提供了便捷，准确的基因定量检测试剂，此反应体系经精心优化，检测特异性强，扩增效率高，为您提供相关基因研究提供了强有力的工具。

相对定量的计算基础

基因表达的相对定量是由实验中得到的阈值循环数（Ct）计算而来。阈值循环数是指在这一个循环时， ΔRn 出现具有统计学意义的增长并且第一次被检测到。这样，在PCR反应时，含有更高初始模板浓度的样品就会比低模板浓度的样品更早到达检测阈值，并得到一个更小的阈值循环数。

一次理想的定量实验中，PCR反应的每个循环中，产物都会成倍增长。因此阈值循环数每相差1个单位就等于2倍的初始模板浓度的差距。例如，如果Ct值增加了1个单位，那么初始模板浓度就减少一倍；如果Ct值减少一个单位，那么就说明初始模板浓度增加了一倍。因此这种属性被应用于计算目标基因和内参基因之间表达的相对定量值。更多信息请参照手册中数据分析部分。

组分和保存

客户定制基因定量检测试剂盒包括以下组分,按照所述条件短期贮存,长期贮存请全部置于-20℃,保质期3个月,如果需要将dNTP、探针等试剂分装成小份避免试剂反复冻融,如反复冻融扩增效果和保质期将会根据冻融次数缩短。

Reagent	Amount				Storage
	50rxns	100rxns	200rxns	500 rxns	
RT buffer (5×)	200μl	400μl	0.8mL	2×1 ml	4℃
dNTP (10mM)	40μl	80μl	160μl	400μl	-20℃
MMLV Reverse Transcriptase(200U//μl)	10μl	20μl	40μl	100μl	-20℃
Random N6 (100uM)	250μl	500μl	1mL	2.5mL	4℃
Gene specific RT primer (10μM)	10μl	20μl	40μl	100μl	4℃
Gene specific primer Set (10μM)	20μl	40μl	80μl	200μl	4℃
Gene specific probe (10μM) ¹	20μl	40μl	80μl	200μl	4℃
ROX reference dye(50×) ²	20μl/100uL	40μl/200uL	80μl/400uL	200μl/1mL	4℃
Real-time PCR Master Mix (2×) ³	0.5mL	1 ml	2×1 ml	5×1 ml	4℃
rTaq DNA polymerase (5U/μl)	10μl	20μl	40μl	100μl	-20℃
RNase free H ₂ O	1.5 ml	1.5 ml	2×1.5 ml	5×1.5 ml	4℃
Sterilized H ₂ O	1.0 ml	1.0 ml	2×1.0m l	5×1.0ml	4℃



NOTE

- 1 Gene specific probe (10μM) 为探针法试剂盒专有的TaqMan探针, 5'标记FAM荧光基团, 3'标记BHQ1荧光基团, 其原理是利用Taq酶的3'→5'外切酶活性, 在PCR过程中水解探针, 从而产生和目的片段同步增长的荧光信号, **请务必将探针避光保存;**
- 2 ROX Reference Dye 是用以校正孔与孔之间产生的荧光信号误差, 需要使用低浓度ROX Reference Dye 校正的仪器有Applied Biosystems 7000/7300/7500/7500 Fast/7900 Real-Time PCR System, 需要使用高浓度ROX Reference Dye 校正的仪器有Applied Biosystems Step OnePlus Real-Time PCR System, 其他品牌仪器不需要ROX校准, **ROX Reference Dye需要避光保存;**
- 3 吉玛的专用的荧光定量PCR缓冲混合液, 预混了反应所需的试剂, 其中染料法试剂盒的Master Mix 含有SYBRGreen I 荧光染料, **需要避光保存**, 而探针法试剂盒的Master Mix 不含荧光染料, 所以不需要避光保存。

用户需要提供的材料

良好光学性能的**PCR管**及**96孔板**

为了消除在荧光检测的步骤中由于PCR管或是PCR96孔板所带来的误差, 我们推荐您使用与ABI PRISM 7000/7300/7500/7900, MX3000p/4000p等仪器配套的PCR管及96孔板。

RNA 酶抑制剂 (RNasin)

方法

1. 基因特异性逆转录引物的稀释

试剂盒中提供的基因特异性逆转录引物是 10 μ M 的贮存液，针对本试剂盒，使用时稀释10倍成1 μ M逆转录引物工作液。在一次标准的基因特异性逆转录中，逆转录引物的终浓度为60nM。此用量针对本试剂盒提供的MMLV酶，如果逆转录酶为客户自购，以说明书为准。



为了节省逆转录试剂和获得更稳定的结果，我们建议可以将数个目标基因逆转录引物(eg. 12 μ l)和内参逆转录引物(eg. GAPDH RT 引物12 μ l)混合，一起稀释10倍成1 μ M逆转录引物工作液，一次逆转录反应同时得到目标基因和内参基因定量PCR cDNA模板，获得和分开逆转录同样的效果。

经试验测试，对于同一样品，内参基因定量RT-PCR无批间差异，结果稳定。

本试剂盒提供了2种逆转录体系，可以根据要求选择其中1种

2.1 随机引物N6逆转录反应体系的制备

A. 在无RNase的离心管中混合下列试剂进行预变性：

Component	Final Con.	Vol/1 rxns
Random N6 (100 μ M)	25nM	5 μ l
RNA Sample ¹	1-3 μ g	2 μ l

¹ RNA 模板量可以根据实验的需要从1 μ g 到3 μ g 或者更多

B. 加热70 $^{\circ}$ C 5min后，马上放于冰盒上；

C.按照下表提供的20 μ l 逆转录反应体系混合其他试剂

Component	Final Con.	Vol/1 rxns
5 \times MMLV RT Buffer	1 \times	4 μ l
dNTP (10mM)	0.375 mM	0.75 μ l
RNasin (40U/ μ l)	0.5U/ μ l	0.25 μ l
MMLV Reverse Transcriptase (200U/ μ l) ¹	40 U	0.2 μ l
RNase Free H ₂ O		To 13 μ l



¹ 在逆转录反应之前须将除了逆转录酶外的各种试剂混匀，可用手指轻弹装试剂的管子，逆转录 mix 可用移液器吸打几次，千万不要用振荡器。

D. 运行逆转录程序：

37 $^{\circ}$ C 60 分钟，85 $^{\circ}$ C 5 分钟，4 $^{\circ}$ C 保存。



逆转录反应 85 $^{\circ}$ C 5 分钟结束后立即将cDNA产物取出，快速置冰上冷却，后续所有步骤都在冰上进行，不要将cDNA产物随便从冰上移走。

2.2 基因特异性逆转录反应体系的制备

A. 在无RNase的离心管中混合下列试剂进行预变性:

Component	Final Con.	Vol/1 rxns
Gene specific RT primer (1 μ M)	60nM	1.2 μ l
RNA Sample ¹	1-3 μ g	2 μ l

¹ RNA 模板量可以根据实验的需要从1 μ g 到3 μ g 或者更多

B. 加热70 $^{\circ}$ C 5min后, 马上放于冰盒上;

C.按照下表提供的20 μ l 逆转录反应体系混合其他试剂

Component	Final Con.	Vol/1 rxns
5 \times MMLV RT Buffer	1 \times	4 μ l
dNTP (10mM)	0.375 mM	0.75 μ l
RNasin (40U/ μ l) ¹	0.5U/ μ l	0.25 μ l
MMLV Reverse Transcriptase (200U/ μ l) ²	40 U	0.2 μ l
RNase Free H2O		To 16.8 μ l



NOTE

¹ RNasin为非必需试剂, 请客户自备;

² 在逆转录反应之前须将除了逆转录酶外的各种试剂混匀, 可用手指轻弹装试剂的管子, 逆转录 mix 可用移液器吸打几次, 千万不要用振荡器。

D. 运行mRNA逆转录程序:

42 $^{\circ}$ C 45 分钟, 85 $^{\circ}$ C 5 分钟, 4 $^{\circ}$ C 保存。



NOTE

逆转录反应 85 $^{\circ}$ C 5 分钟结束后立即将cDNA产物取出, 快速置冰上冷却, 后续所有步骤都在冰上进行, 不要将cDNA产物随便从冰上移走。

3.mRNA 逆转录产物的操作

将cDNA产物取2 μ l作为荧光定量PCR反应的模板, 如果逆转录引物工作液是多种基因逆转录引物的混合液, 此cDNA产物可作为其荧光定量PCR反应共同模板。cDNA暂时不用, 可将其存放于-20 $^{\circ}$ C, 三天内可保持稳定, 长期保存请冻存于-80 $^{\circ}$ C。

4. 定量 PCR 反应 mix 制备

1. 确保2×Master Mix(如果保存在-20℃)、50×ROX Reference Dye、引物、模板完全溶解，所有的试剂都在管底或板孔底部，建议客户在使用前混匀并低速离心。
2. 建议置于冰上进行Real Time PCR反应液的配制：

表一、染料法定量 PCR 20μl反应体系

Component	Final Con.	Vol /1 rxns
2×Real-time PCR Master Mix (SYBR)	1×	10μl
Gene specific Primer set(10μM) ¹	0.2μM	0.4μl
ROX reference dye(50×) ³	1× or 5×	0.4μl or 2μl
Taq DNA polymerase (5U/μl)	1 U	0.2μl
RT product		2μl
Sterilized H ₂ O		To 20μl

表二、探针法定量 PCR 20μl反应体系

Component	Final Con.	Vol /1 rxns
2×Real-time PCR Master Mix (FAM)	1×	10μl
Gene specific Primer set (10μM) ¹	0.2μM	0.4μl
Gene specific Probe (10μM) ²	0.10μM-0.20μM	0.2 μl-0.40ul
ROX reference dye(50×) ³	1× or 5×	0.4μl or 2μl
Taq DNA polymerase (5U/μl)	1 U	0.2μl
RT product		2μl
Sterilized H ₂ O		To 20μl



NOTE

¹ 引物终浓度为0.2 μM可以在大多数体系中获得良好的扩增结果。可以在0.1-0.5μM范围内调整：扩增效率不高时，可增加PCR反应体系中的引物浓度；发生非特异扩增时，可适当减少PCR反应体系中的引物浓度；

² 探针体系会因序列不同浓度有所调整，表中给出的是通用的范围，每个试剂盒都经过吉玛公司精心的验证，具体条件可以质检报告所述条件为参考；

³ ROX Reference Dye 是用以校正孔与孔之间产生的荧光信号误差，Applied Biosystems 7000/7300/7500/7500 Fast/7900 Real-Time PCR System 配套ROX 终浓度1× (0.4μl)，Applied Biosystems Step OnePlus Real-Time PCR System 配套ROX 终浓度为5× (2μl)，其他品牌仪器不需要ROX校准。

5. 实时定量 PCR 反应程序

阶段	循环	温度	时间	荧光信号采集
预变性	1×	95℃	3 min	
PCR反应	40×	95℃	12 seconds	
		62℃	40 seconds	采集



NOTE

染料法荧光基团选择SYBR，探针法荧光基团选择FAM，淬灭基团选择NONE；需要ROX校准的仪器选择ROX作为校准染料。

数据分析

1. 设置一个校正样品

在做相对定量之前，首先必须确定校正样品，通常校正样品可以是正常的或是没经过实验处理的样品。

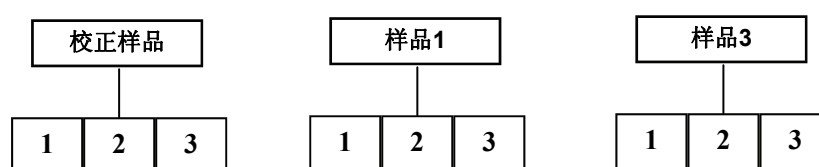
2. 选择合适基因作为标准化内参

相对Ct法定量，标准化基因通常为管家基因或者一些经过表达谱分析验证过的基因。可以用目标基因的Ct值减去标准化基因的Ct值得到校正样品和其他样品的 ΔCt 。我们推荐任何一个样品的标准化基因的Ct值不能大于或等于30，如果该基因的Ct值确实稳定在30或以上，您可以考虑增加用于逆转录的初始总RNA的量。

计算 目标基因相对于 标准化基因的表达比率

每个样品对应每个基因至少要做 2-3 个复孔

第一步
设计基因
相对定量实验



第二步
进行荧光定量 PCR
反应来得到每个反
应的目标基因和标
准化基因的Ct值

	校正样品		样品 1		样品2	
	GAPDH	P53	GAPDH	P53	GAPDH	P53
Ct 1	24.60	26.21	23.63	30.40	22.66	24.21
Ct 2	24.31	26.15	23.40	30.35	22.56	24.60
Ct 3	24.72	26.35	23.52	30.41	22.48	24.66



注意复孔间的Ct值差异不要大于0.5，否则我们推荐重复实验

第三步
计算样品和校正样
品三复孔的平均值

	校正样品		样品 1		样品2	
	GAPDH	P53	GAPDH	P53	GAPDH	P53
Average Ct	24.54	26.24	23.51	30.39	22.49	22.56

$$\text{Sample 1 } \Delta\text{Ct} = \text{Ct}(\text{P53}) - \text{Ct}(\text{GAPDH}) = 30.39 - 23.51 = 6.88$$

第四步

目标基因的平均Ct值
减去GAPDH的Ct平
均值, 计算各个样
品的 ΔCt 值

	校正样品		样品 1		样品2	
	GAPDH	P53	GAPDH	P53	GAPDH	P53
Average Ct	24.54	26.24	23.51	30.39	24.49	22.56
ΔCt	-	1.70	-	6.88	-	1.93

$$\Delta\Delta\text{Ct}(\text{sample1}) = \Delta\text{Ct}(\text{sample1}) - \Delta\text{Ct}(\text{calibrator1}) = 6.88 - 1.70 = 5.18$$

第五步

样品的 ΔCt 值减去校
正样品的 ΔCt 值,
计算得到各个样品
的 $\Delta\Delta\text{Ct}$ 值

	校正样品		样品 1		样品2	
	GAPDH	P53	GAPDH	P53	GAPDH	P53
Average Ct	24.54	26.24	23.51	30.39	24.49	22.56
ΔCt	-	1.70	-	6.88	-	1.93
$\Delta\Delta\text{Ct}$	-	0.00	-	5.18	-	0.23

$$\text{Relative Expression Ratio}(\text{sample1}) = 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}(\text{sample1}) = 2^{-5.18} = 0.027$$

第六步

计算相对表达比率

	校正样品		样品 1		样品2	
	GAPDH	P53	GAPDH	P53	GAPDH	P53
Average Ct	24.54	26.24	23.51	30.39	24.49	22.56
ΔCt	-	1.70	-	6.88	-	1.93
$\Delta\Delta\text{Ct}$	-	0.00	-	5.18	-	0.23
$2^{\Delta\Delta\text{Ct}}$	-	1.00	-	0.027	-	0.85

附录

万维网

您可以通过浏览器访问吉玛网站，获取我们的网络资源：

- 下载PDF格式的手册
- 搜索我们的产品目录号和完整的彩色图解说明
- 能够获得我们热销的新产品和特有产品的信息
- 获得吉玛公司产品的引证
- 索要产品目录以及相关产品宣传资料

联系我们

如果您需要更多的信息或者技术上的帮助，请打电话或者电子邮件来联系我们

上海吉玛制药技术有限公司

地址：上海张江高科技园区哈雷路1011号

电话：86-21-51320195

传真：86-21-51320295

E-mail: service@genepharma.com

网址: www.genepharma.com

苏州吉玛基因股份有限公司

地址：苏州工业园区生物纳米科技园东平街199号

邮编：215125

电话：0512-86668828

传真：0512-86665900

E-mail: szservice@genepharma.com

网址: www.genepharma.com

©2005 - 2006 Genepharma Corporation. All rights reserved. For research use only. Not intended for any animal or human