

GMO 元件 tE9 终止子探针法 qPCR 试剂盒

GMO Element tE9 Probe PCR Kit

仅

供

科

研

使

用

<p>产品及特点</p>	<p>用 PCR 筛查转基因植物的时候，通常选择外源启动子、外源功能基因或外源终止子等 GMO 元件作为靶分子。如果待测样本中有上述靶分子存在，就可以初步断定该样本中有转基因成分。tE9 终止子就是这样一种靶分子，它本是豌豆 (<i>Pisum sativum</i> L.) 核酮糖-1, 5 二磷酸羧化酶小亚基 E9 (ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase small subunit E9, rbcS E9) 基因的终止子。本产品就是根据其设计的探针法 qPCR 试剂盒，它具有下列特点：</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 即开即用，用户只需要提供样品 DNA 模板。 2. 引物和探针经过优化，灵敏度高，检测限可达 100 拷贝/反应。 3. 提供阳性对照，便于区分假阴性样品。 4. 特异性高，引物是根据 tE9 终止子 DNA 设计，不会跟其它 DNA 发生交叉反应。 5. 既可用于定性检测，又可用于定量检测。用于定量检测时，线性范围至少 5 个数量级。 6. 本产品足够 50 次 20 μL 体系的探针法荧光定量 PCR 反应。 7. 本产品只能用于科研。 																											
<p>规格及成分</p>	<table border="1"> <thead> <tr> <th>成分</th> <th>规格</th> <th>包装</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>2×Probe qPCR MasterMix</td> <td>500μL</td> <td>0.5mL 本色管</td> </tr> <tr> <td>荧光 PCR 专用模板稀释液</td> <td>1mL</td> <td>1.5mL 绿盖管</td> </tr> <tr> <td>超纯水</td> <td>1mL</td> <td>1.5mL 蓝盖管</td> </tr> <tr> <td>tE9 终止子 qPCR 引物-探针干粉</td> <td>50 次</td> <td>0.5mL 棕色管</td> </tr> <tr> <td>tE9 终止子阳性对照(1E7 拷贝/μL)</td> <td>50μL</td> <td>0.5mL 黄盖管</td> </tr> <tr> <td>使用手册</td> <td>1 份</td> <td>无</td> </tr> <tr> <td colspan="3" style="text-align: center;">本产品采用五孔盒包装</td> </tr> <tr> <td colspan="3"> <p>注意：引物-探针干粉在使用前需要短暂离心，然后在离心管中加入 165μL 的超纯水充分混匀后再使用，未用完的需要-20$^{\circ}$C 保存。</p> </td> </tr> </tbody> </table>	成分	规格	包装	2×Probe qPCR MasterMix	500 μ L	0.5mL 本色管	荧光 PCR 专用模板稀释液	1mL	1.5mL 绿盖管	超纯水	1mL	1.5mL 蓝盖管	tE9 终止子 qPCR 引物-探针干粉	50 次	0.5mL 棕色管	tE9 终止子阳性对照(1E7 拷贝/ μ L)	50 μ L	0.5mL 黄盖管	使用手册	1 份	无	本产品采用五孔盒包装			<p>注意：引物-探针干粉在使用前需要短暂离心，然后在离心管中加入 165μL 的超纯水充分混匀后再使用，未用完的需要-20$^{\circ}$C 保存。</p>		
成分	规格	包装																										
2×Probe qPCR MasterMix	500 μ L	0.5mL 本色管																										
荧光 PCR 专用模板稀释液	1mL	1.5mL 绿盖管																										
超纯水	1mL	1.5mL 蓝盖管																										
tE9 终止子 qPCR 引物-探针干粉	50 次	0.5mL 棕色管																										
tE9 终止子阳性对照(1E7 拷贝/ μ L)	50 μ L	0.5mL 黄盖管																										
使用手册	1 份	无																										
本产品采用五孔盒包装																												
<p>注意：引物-探针干粉在使用前需要短暂离心，然后在离心管中加入 165μL 的超纯水充分混匀后再使用，未用完的需要-20$^{\circ}$C 保存。</p>																												
<p>使用方法</p>	<p>一、稀释标准曲线样品 (以 1E1-1E6 拷贝/μL 这 6 个 10 倍稀释度为例)。</p> <p>由于标准品浓度非常高，因此下列稀释操作一定要在独立的区域进行，千万不能污染样品或本试剂盒的其他成分。本产品不提供活体样品做阳性对照，只提供 DNA 片段作为阳性对照。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 标记 6 个离心管，分别为 6, 5, 4, 3, 2, 1。 2. 用带芯枪头分别加入 45 μL 荧光 PCR 专用模板稀释液，用带芯枪头 (下同)。 																											

3. 在 6 号管中加入 5 μL 1E7 拷贝/ μL 的阳性对照(试剂盒提供), 充分震荡混匀 1 分钟, 得到 1E6 拷贝/ μL 的标准曲线样品。放冰上待用。
4. 换枪头, 在 5 号管中加入 5 μL 1E6 拷贝/ μL 的阳性对照(上步稀释所得), 充分震荡混匀 1 分钟, 得到 1E5 拷贝/ μL 的标准曲线样品。放冰上待用。
5. 换枪头, 在 4 号管中加入 5 μL 1E5 拷贝/ μL 的阳性对照(上步所得), 充分震荡混匀 1 分钟, 得到 1E4 拷贝/ μL 的标准曲线样品。放冰上待用。
6. 依次重复上面的操作得到 6 个稀释度的标准曲线样品。放冰上待用。

二、样品 DNA 的制备

7. 如果有 N 个样品, 设置 N+2 个提取, 多出的一个是 PC (样品制备阳性对照), 一个是 NC (样品制备阴性对照)。可以用 10 μL 上步所得 4 号稀释液再加上一定量的水使总体积跟每次制备要求的体积一样, 以此作为 PC。另外用水作为 NC。
8. 用自选方法纯化样品的 DNA, 本试剂盒跟市场上大多数样品 DNA 提取试剂盒兼容。也可以选购本公司的免提取核酸释放剂。

三、qPCR 反应 (20 μL 体系, 在样品制备室进行)

9. 如果做定量分析并且只做 1 次重复, 则标记 N+9 个 PCR 管, 其中 N+2 个用于上步得到的 N+2 个样品, 1 个用于 PCR 阴性对照 (用水做模板), 6 个用于标准曲线。如果做定性分析并且只做 1 次重复, 则标记 N+4 个 PCR 管, 其中 N+2 个用于上步得到的 N+2 个样品, 1 个用于 PCR 阴性对照 (用水做模板), 1 个用于 PCR 阳性对照 (直接用第 6 步第 4 号管的阳性对照稀释液做模板)。下面只以定量分析为例描述操作步骤。

10. 在标记管中按下表加入各成分 (本表只列出一次重复。样品管和阴性对照设置完毕后才设置阳性对照, 并且阳性对照样品要等所有管子盖上盖子储存好后加) :

成分	样品管 N+2 个	PCR 阴性对照	标准曲线样品管 (1-6 管)
2×Probe qPCR MasterMix	各 10 μL	10 μL	各 10 μL

tE9 终止子 qPCR 引物-探针混合液	各 3 μ L	3 μ L	各 3 μ L
N+2 个待测 DNA 样本	各 7 μ L	不加	不加
超纯水	不加	7 μ L	不加
第 6 步所得标准曲线样品稀释液 (1-6 号)	不加	不加	各 7 μ L

11. 盖上盖子后上机，按下面参数进行 PCR：

过程	温度	时间
预变性	95 $^{\circ}$ C	10min
PCR 反应 (40 个循环)	95 $^{\circ}$ C	15sec
	60 $^{\circ}$ C	1 min(采集 FAM 通道荧光信号,淬灭基团为 TAMRA)

四、数据处理

12. 如果扩增阳性对照或制备阳性对照结果为阴性，则整个扩增或制备实验无效，不需要分析数据，需要重做扩增或制备或跟厂家联系。如果扩增阴性对照或制备阴性对照结果为阳性，说明环境污染，则整个扩增或制备实验无效，不需要分析数据，需要跟厂家联系，购买新的引物和探针。

13. 如果阴性对照和阳性对照正常，则实验有效，可以进入后续分析。

14. 如果把本试剂盒用于定量检测，则以阳性对照浓度的 log 值为横轴，以 Ct 值为纵轴，绘制标准曲线。再以待测样品的 Ct 值从标准曲线上推算出样品 DNA 浓度的 log 值，再推算出其浓度。

15. 如果把本试剂盒用于定性检测，只判断阳性或阴性，则阴性对照必须无 Ct 或 Ct 大于或等于 40。阳性对照必须有荧光对数增长，有典型扩增曲线，Ct 值应该小于 40，否则实验无效。如果实验有效，则分析待测样品，如果无 Ct 或 Ct 大于或等于 40，则为阴性。如果 Ct 小于 40 则为阳性。

PCR 编号	TW-E10161
说明书	1 份
自备试剂	超纯水，样品 DNA

运输及保存

低温运输, -20°C保存, 有效期 2 年

生产企业: 上海通蔚实业有限公司

公司地址: 上海市松江区九亭镇研展路158弄15号1603

公司电话: 021-54845833

技术支持: 15800441009